

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM FOSFOLIPASES A₂ E
FOSFOLIPASES A₂ HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni

GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Marcos Roberto de Mattos Fontes

**BOTUCATU – SP
2012**



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM FOSFOLIPASES A₂ E
FOSFOLIPASES A₂ HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni

GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas:
estrutura e função*.

Marcos Roberto de Mattos Fontes

**BOTUCATU – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Salvador, Guilherme Henrique Marchi.

Estudos estruturais com fosfolipases A₂ e fosfolipases A₂ homólogas isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* / Guilherme Henrique Marchi
Salvador. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Capes: 2090100

1. Bothrops. 2. Jararaca (Cobra) – Veneno. 3. Proteínas. 4. Cristalografia.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases A₂; Venenos de serpentes.

...aos meu pais: Eliana e Prudente...

...aos meus irmãos Daniela e Luciano...

...à minha namorada Paula...

...ao meu amigo e orientador Marcos...

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcos Fontes, pela amizade e todos os conhecimentos transmitidos durante estes anos de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou o presente projeto de pesquisa (Processo 2010/02799-8).

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares e sua equipe pelo fornecimento das amostras utilizadas.

Aos profs. Dr. Cristiano L. P. Oliveira e Dr. Roberto M. Fernandez, pelos experimentos de SAXS deste trabalho.

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

À Agnes (obrigado pelos ensinamentos e paciência em todas as prévias!!!), Angelo (valeu pela ajuda em minhas dúvidas) e Carlos (muito obrigado pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos e companherismo).

Aos colegas e amigos do laboratório Andréa, Juliana, Natália e Rafael por todas as trocas de conhecimento e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do LBBC Guilherme, Letícia, Luiz Augusto e Márcio por todos os momentos de felicidade que passamos e ajuda neste e outros trabalhos.

Aos meus queridos irmãos, Daniela (obrigado pelos conselhos pessoais e profissionais) e Luciano, que sempre estará presente em minha vida e que a falta que me faz é indescritível.

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

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

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM FOSFOLIPASES A₂ E FOSFOLIPASES A₂ HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Resumo

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Uma das principais complicações deste tipo de acidente é o dano muscular, que muitas vezes pode evoluir para necrose. Estes danos podem estar relacionados à ação de fosfolipases A₂ (Asp49-PLA₂) e fosfolipases A₂ homólogas (dentre as quais se encontram as Lys49-PLA₂s) presentes nos venenos botrópicos. Esta complicação relacionada ao envenenamento ofídico não é atualmente contornada pela administração de 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, desenvolver tratamentos complementares à soroterapia. Neste trabalho, por meio de estudos utilizando a técnica de cristalografia de raios X, realizamos estudos comparativos entre a BmooPLA₂-I e outras Asp49-PLA₂s que inibem a agregação plaquetária e sugerimos que outras regiões além do sítio proposto anteriormente são responsáveis por esta atividade biológica. Estudos com a MjTX-II e outras Lys49-PLA₂s também foram realizados e propuseram que moléculas de cadeia longa, como ácidos graxos e os polietilenoglicóis (PEGs), possuem contribuição direta para a cristalização destas toxinas. Além disso, estes compostos interagem com o sítio ativo, causando, em alguns casos, a hiperpolarização dos resíduos Cys29/Gly30 pelo Lys122, reforçando assim a teoria que propõe que a atividade catalítica das Lys49-PLA₂s não é somente inibida pela presença da cadeia lateral da Lys49 junto ao *loop* de ligação de cálcio, mas também por outros fatores estruturais. Por fim, estudos com a MjTX-I revelaram que esta toxina é diferenciada das outras Lys49-PLA₂s, visto que sua estrutura cristalográfica apresenta quatro moléculas na unidade assimétrica e uma configuração distinta do sítio miotóxico já proposto para as Lys49-PLA₂s. Outros estudos em solução, utilizando técnicas espectroscópicas (espalhamento dinâmico de luz (DLS) e de raios X a baixos ângulos (SAXS)) e cromatografia de exclusão molecular, mostraram que esta toxina apresenta uma tendência a formar oligômeros. Também foi possível constatar através dos dados de SAXS que a estrutura da MjTX-I na forma dimérica apresenta conformação oligomérica semelhante ao chamado “dímero convencional” proposto para as Lys49-PLA₂s, o que pode estar relacionado a novas funcionalidades desta toxina advindas do processo evolutivo da *Bothrops moojeni*, cujo *habitat* de cerrado é bastante distinto daquele ocupado por outras serpentes do mesmo gênero.

Palavras chave: *Bothrops moojeni*; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases A₂; Venenos de serpentes.

STRUCTURAL STUDIES WITH PHOSPHOLIPASES A₂ AND HOMOLOGUE PHOSPHOLIPASES A₂ ISOLATED FROM *Bothrops moojeni* SNAKE VENOM

Abstract

Bothrops snakes are responsible for the most part of the snakebites that occur in Brazil. A major complication of this type of accident is muscle damage, which can often progress to necrosis. This damage may be related to the action of phospholipases A₂ (Asp49-PLA₂s) and homologue phospholipases A₂ (including Lys49-PLA₂s) present in *Bothrops* venoms. This complication related to snakebite is not currently solved by the administration of ophidic serum and, therefore, several studies have been conducted in attempt to understand the pharmacological sites of these toxins and to develop complementary treatments to serum therapy. In this work, we performed a comparative crystallographic study between BmooPLA₂-I and other Asp49-PLA₂s which present inhibiting-platelet aggregation activity using protein crystallography. The results suggest that some regions distinct from the site proposed by prior works could be responsible by this biological activity. Studies with MjTX-II and other Lys49-PLA₂s were also performed and it was proposed that long-chain molecules, such as fatty acids and polyethylene glycols (PEGs), contribute to the crystallization of these toxins. Besides, these compounds interact with the active site, thus causing the hyperpolarization of the Cys29/Gly30 residues via Lys122. These findings reinforce the theory which establishes the catalytic activity of Lys49-PLA₂s is not abolish only by the presence of the Lys49 sidechain close to the calcium binding loop, but also due to other structural features. Finally, studies with the MjTX-I revealed that this toxin is different from other Lys49-PLA₂s since its crystal structure presents four molecules in the asymmetric unit and a distinct configuration of the myotoxic site as previously proposed for other Lys49-PLA₂s. Other studies with MjTX-I using spectroscopy techniques (dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS)) and size exclusion chromatography showed that this toxin tends to form oligomers in solution. In addition, the SAXS experiments indicated the dimeric conformation of MjTX-I is similar to “conventional dimer” proposed for Lys49-PLA₂s, suggesting new functionalities for this toxin, probably related to the adaptation of *Bothrops moojeni* to cerrado environments, a very distinct habitat in relation to those occupied by other snakes from the same genus.

Key words: *Bothrops moojeni*; Protein crystallography; Phospholipases A₂; Snake venom.

Sumário

1- Introdução	13
1.1 – Acidentes ofídicos	14
1.2 – Venenos de serpentes e Fosfolipases A ₂	15
1.3 – Complexos formados por Fosfolipases A ₂	18
1.4 – Outras funções de svPLA ₂ s	19
1.5 – Fosfolipases A ₂ homólogas	20
1.6 – Conformação dimérica das Lys49-PLA ₂ s	22
2 – Objetivos	24
3 – Materiais e Métodos	26
3.1 – Estudos estruturais	27
3.2 – Obtenção de amostras – purificação	28
3.3 – Amostras utilizadas nos experimentos	28
3.3.1 – BmooPLA ₂ -I	28
3.3.2 – MjTX-II	29
3.3.3 – MjTX-I	29
3.4 – Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	29
3.5 – Cristalização	31
3.6 – Coleta de dados de difração de Raios X	34
3.7 – Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura protéica	37
4 – Resultados e discussão	39
4.1 – BmooPLA ₂ -I	40
4.1.1 – Estudos de DLS e cristalização	40
4.1.2 – Estrutura cristalográfica	42
4.1.3 – Análise estrutural	44
4.2 – MjTX-II	47
4.2.1 – Cristalização, coleta, processamento e refinamento dos dados	47
4.2.2 – Análise estrutural	50
4.3 – MjTX-I	54
4.3.1 – Cristalização, coleta e processamento dos dados	54
4.3.1.1 – Determinação da estrutura, refinamento e análise estrutural	56
4.3.2 – Espalhamento dinâmico de luz	61
4.3.3 – Cromatografia de exclusão molecular	62
4.3.4 – Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)	63
5 – Conclusões	67
5.1 – Perspectivas	69

6 – Publicações.....	70
7 – Referências Bibliográficas	72

Lista de Figuras

Figura 01: Distribuição geográfica da <i>B. moojeni</i> no território brasileiro	15
Figura 02: Representação esquemática de um fosfolípídeo e os locais de atuação das diferentes fosfolipases.....	16
Figura 03: Enovelamento de uma PLA ₂ (BmooPLA ₂ -I isolada do veneno de <i>B. moojeni</i>).....	17
Figura 04: Representação esquemática de ligações covalentes e não covalentes entre complexos de PLA ₂ de veneno de serpentes.....	18
Figura 05: (a) <i>Loop</i> de ligação de Ca ⁺² de uma Asp49-PLA ₂ de <i>Naja naja naja</i> . (b) Região análoga à região de ligação de Ca ⁺² da BaspTX-II (Lys49-PLA ₂) do veneno de <i>Bothrops asper</i>	21
Figura 06: Representação em <i>cartoon</i> das duas possibilidades de dímeros em PLA ₂ s	22
Figura 07: Fluxograma que demonstra de maneira simplificada as etapas para a resolução de uma estrutura protéica	27
Figura 08: Esquema simplificado do experimento de espalhamento dinâmico de luz	30
Figura 09: Diferentes tipos de agregações presentes em solução. (a) Monomodal monodispersa e polidispersa; (b) Multimodal monodispersa e polidispersa.....	31
Figura 10: Representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma proteína.....	32
Figura 11: Método de difusão de vapor, sistemas: <i>a. hanging drop</i> e <i>b. sitting drop</i>	34
Figura 12: Representação gráfica de um cristal. O centro da cela unitária é indicado por um ponto (•) e cada molécula de proteína está representada por meias-lua (☾).....	35
Figura 13: <i>a.</i> Aparato que sustenta o <i>loop</i> , <i>b.</i> Figura esquemática do modo em como o monocristal é preso ao <i>loop</i> , onde em (1) o cristal na gota, (2) como cristal é colocado no aparato com o <i>loop</i> e em (3) o cristal preso ao <i>loop</i> , <i>c.</i> detalhe do cristal preso ao <i>loop</i> por tensão superficial	35
Figura 14: Imagem de difração de raios X. (Miotoxina - I do veneno de <i>B. moojeni</i>)	36
Figura 15: Gráfico de DLS da BmooPLA ₂ -I na temperatura de 10°C.....	40
Figura 16: Cristal de BmooPLA ₂ -I a 18°C após 20 dias.....	41
Figura 17: Estrutura final da BmooPLA ₂ -I.....	43
Figura 18: Gráfico de Ramachandran da estrutura final BmooPLA ₂ -I	44

Figura 19: Alinhamento do segmento do C-terminal sugerido por ser a região responsável pela ação de inibição de agregação plaquetária com o mesmo segmento da BaspPLA2-II, que não possui esta função.....	45
Figura 20: Região proposta para a ação de inibição de agregação plaquetária destacada em <i>sticks</i>	45
Figura 21: Sobreposição das estruturas da BmooPLA ₂ -I, BthA-I e BthA-I + BPB, onde a molécula de BPB ligada ao sítio ativo da molécula de proteína.....	46
Figura 22: Cristal de MjTX-II a 18°C após 32 dias	47
Figura 23: Estrutura final da MjTX-II	49
Figura 24: Gráfico de Ramachandran da estrutura final MjTX-II	50
Figura 25: Sobreposição das estruturas da MjTX-II complexada e MjTX-II nativa	50
Figura 26: Sobreposição das moléculas de PEG4000 da MjTX-II e PEG4000 da BthTX-I/PEG4000, ácido esteárico da estrutura da MjTX-II/Ácido esteárico e ácido graxo da estrutura da PrTX-II na região do sítio ativo	52
Figura 27: Distância das moléculas de (a) PEG4000 da MjTX-II, (b) ácido graxo da MjTX-II + Ácido graxo, (c) ácido graxo da PrTX-II e (d) PEG4000 da estrutura da BthTX-I + PEG4000	53
Figura 28: Posições das cadeias laterais dos resíduos de Lys122 em ligação peptídica com Cys29 e Gly30.....	54
Figura 29: Monocristais de MjTX-I a 18°C	55
Figura 30: Estrutura final da MjTX-I.....	56
Figura 31: Gráfico de Ramachandran da estrutura final MjTX-I	58
Figura 32: Alinhamento da MjTX-I com outras Lys49-PLA ₂ s de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	60
Figura 33: (a) Local do sítio miotóxico na estrutura da PrTX-I e os resíduos 20, 115, 118 e 119 estão destacados em amarelo. (b) A mesma região na estrutura da MjTX-I com os mesmos resíduos destacados em vermelho. (c) Sobreposição das estruturas da PrTX-I e MjTX-I e os resíduos do sítio secundário destacados na cor alaranjado.....	61
Figura 34: Dados de DLS obtidos a partir de experimentos onde a toxina foi diluída em água e em Tris HCl pH8,0.....	62
Figura 35: Cromatografia de exclusão de tamanho da MjTX-I em 20mM de Tris HCl pH8,0	63
Figura 36: Dados experimentais de SAXS que corresponde à ajustes da MjTX-I+água e MjTX-I + Tris HCl.....	64
Figura 37: Função de distribuição [p(r)] da MjTX-I+água e MjTX-I + Tris HCl	65

Figura 38: (a) Curvas de espalhamento dos dímeros convencional e alternativo, onde o melhor ajuste dos resultados experimentais é da conformação convencional para a MjTX-I. (b) Envelope eletrônico da MjTX-I na conformação convencional. (c) Envelope eletrônico da MjTX-I na conformação alternativa.....66

Lista de Tabelas

Tabela 01: Estatísticas de coleta de dados e processamento da BmooPLA ₂ -I.....	42
Tabela 02: Estatísticas de refinamento da BmooPLA ₂ -I	43
Tabela 03: Estatísticas de coleta de dados e processamento da MjTX-II	48
Tabela 04: Estatísticas de refinamento da MjTX-II	49
Tabela 05: Soluções precipitantes das moléculas depositadas no banco de dados (PDB).....	51
Tabela 06: Estatísticas de coleta de dados e processamento da MjTX-I.....	55
Tabela 07: Estatísticas de refinamento da MjTX-I	57
Tabela 08: Lista de resíduos envolvidos nos contatos, como ligações de hidrogênio e pontes salinas, entre os monômeros A/B e C/D	59
Tabela 09: Valores médios da função de distribuição [p(r)]	65

Abreviaturas

PLA₂: Fosfolipase A₂.

svPLA₂: Fosfolipases A₂ de veneno de serpentes.

Lys49-PLA₂: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de lisina na posição 49.

Asp49-PLA₂: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de ácido aspártico na posição 49.

BthTX-I: Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu*.

BthTX-II: Bothropstoxina II de *Bothrops jararacussu*.

BaspTX-II: toxina isolada do veneno de *Bothrops asper*.

PrTX-I: Piratoxina I de *Bothrops pirajai*.

PrTX-II: Piratoxina II de *Bothrops pirajai*.

BthA-I: Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*.

BpirPLA₂-I: Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai*.

BaspPLA₂-II: Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Bothrops asper*.

BmooPLA₂-I: Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*.

MjTX-I: Miotoxina I de *Bothrops moojeni*.

MjTX-II: Miotoxina II de *Bothrops moojeni*.

PEG: polietileno glicol.

BPB: brometo de *p*-bromofenacil

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

SAXS: espalhamento de Raios X a baixo ângulo.

DLS: espalhamento dinâmico de luz.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O temor por serpentes são tradicionais do pensamento popular, porém esse medo ainda não é suficiente para motivar maior eficiência no controle dos acidentes causados por estes animais. No Brasil, os acidentes ofídicos são de notificação obrigatória, o que estabeleceu entre o Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde um sistema de troca de soros, onde é possível o planejamento de ações de controle e maior eficácia no tratamento em caso de acidentes (CARDOSO; WEN, 2003).

1.1 – Acidentes ofídicos

Acidentes causados por serpentes são um problema de saúde pública que afeta principalmente regiões de clima tropical, subtropical e áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina (PINHO; PEREIRA, 2001). Somente a partir de abril de 2009, passou-se a dar maior atenção a este problema, pois neste período os acidentes ofídicos foram incluídos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Este recente levantamento de dados mostra que acidentes causado por picadas de serpentes matam mais do que algumas das doenças presentes na lista de doenças negligenciadas da OMS, como dengue, cólera, leishmaniose, esquistossomose, encefalite japonesa e doença de chagas. Estima-se que ocorrem no mínimo 420 mil envenenamentos por serpentes por ano no mundo, resultando em ao menos 20 mil mortes (WILLIAMS *et al.*, 2010)

O estudo aprofundado de venenos de serpentes e seus componentes pode ser uma área promissora na busca e desenvolvimento de novos medicamentos que podem complementar a soroterapia, pois atualmente é o único tratamento capaz de neutralizar a ação dos venenos. Estes soros podem evitar ou reverter a maioria dos efeitos dos envenenamentos ofídicos, desempenhando um papel importante na morbidade e mortalidade. Este tipo de tratamento foi incluído na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS e o soro deve ser componente de pacotes para cuidados primários de saúde em locais que ocorrem acidentes ofídicos (KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

No Brasil, a família Viperidae representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, devido à quantidade e gravidade dos acidentes causados por serpentes desta família (MELGAREJO, 2003). A subfamília Crotalinae é uma das representantes da

família Viperidae e sua característica única e exclusiva é a presença da fosseta loreal, que fica situada entre os olhos e a narina (FERRAREZZI, 1994).

Serpentes do gênero *Bothrops* são uma das representantes da subfamília Crotalinae e são de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (ARAÚJO *et al.*, 2003). Uma espécie pertencente a este gênero é a *Bothrops moojeni*, popularmente conhecida como caibaca. É uma espécie que pode chegar a 1,5 m, apresenta comportamento bastante agressivo e a importância médica têm crescido, pois consegue se adaptar a vários ambientes e é a principal espécie de *Bothrops* dos cerrados, que são grandes áreas rurais de formação aberta que se estendem do Brasil central até o sul do estado do Paraná (grande parte dos acidentes ofídicos ocorrem em áreas rurais) (Figura 01) (HOGE, 1965; MELGAREJO, 2003).



Figura 01: Distribuição geográfica da *B. moojeni* no território brasileiro (Adaptado de MELGAREJO, 2003).

1.2 – Venenos de serpentes e Fosfolipases A₂

Venenos de serpentes são misturas complexas de componentes orgânicos e inorgânicos com diferentes atividades biológicas, onde mais de 90% do seu peso seco é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas como proteases (metaloproteases e serinoproteases), fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidases, entre outras (MATSUI *et al.*, 2000; BAILEY; WILCE, 2001), que atuam sobre os sistemas vitais da vítima ou da presa. Estes venenos podem apresentar algumas variações intra-específicas de acordo com as famílias, gêneros e espécies ou mesmo dentro da mesma espécie, que podem ser resultantes de dispersões geográficas, variações sazonais e diferenças ontogenéticas e sexuais (MARKLAND, 1998; CALVETE *et al.*, 2007; PANFOLI *et al.*, 2010).

Um dos componentes do veneno são as fosfolipases A₂ (PLA₂s – E.C. 3.1.1.4), que são enzimas encontradas em vários organismos e amplamente estudadas (KINI, 2003; SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Estas enzimas são classificadas em intracelulares e extracelulares (ARNI; WARD, 1996; SIX; DENNIS, 2000). PLA₂s intracelulares são enzimas cálcio-dependentes dotadas de elevada massa molecular (85 kDa) geralmente associadas a membranas e envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, sinalização celular e remodelamento de fosfolipídios (MUKHERJEE *et al.*, 1994; ARNI; WARD, 1996; SIX; DENNIS, 2000). PLA₂s extracelulares são enzimas abundantes em muitos fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios, venenos de répteis (serpentes e lagartos) e artrópodes (insetos) (ARNI; WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999). Estas enzimas também são cálcio-dependentes e, no entanto, possuem baixa massa molecular (12 a 15 kDa), apresentando entre 119 a 143 aminoácidos. Adicionalmente, caracterizam-se pela grande estabilidade molecular e atuam hidrolisando a ligação éster *sn*-2 dos fosfolipídios (Figura 02). Os produtos liberados na atividade catalítica das PLA₂s são lisofosfolipídios e ácidos graxos, além dos ácidos oléico (reserva energética) e aracdônico (precursor de eicosanóides, que atuam como mediadores de inflamações) (ARNI; WARD, 1996; WAITE, 1997).

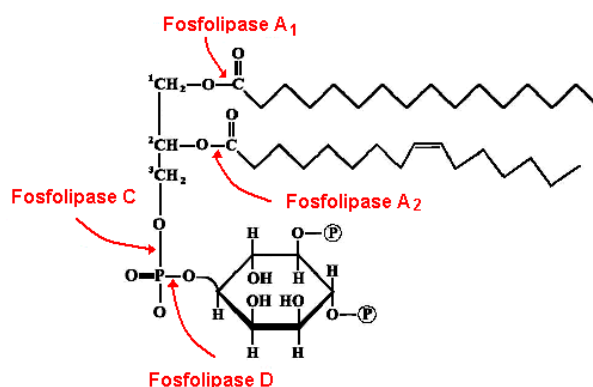


Figura 02: Representação esquemática de um fosfolipídio e os pontos de atuação das diferentes fosfolipases (LEHNINGER, 1993).

Anteriormente, as PLA₂s eram classificadas e divididas em onze grupos, com base no número de pontes dissulfeto e na semelhança das sequências de aminoácidos (SIX; DENNIS, 2000). A partir da evolução de técnicas de biologia molecular, novas PLA₂s foram descobertas e uma nova classificação foi elaborada, na qual as PLA₂s são divididas em quinze grupos, que podem ser organizados em cinco grupos maiores: PLA₂s secretadas (sPLA₂s – divididas em dezesseis subgrupos, incluindo as PLA₂s de veneno de serpentes (svPLA₂s)),

PLA₂s Ca⁺² independentes (iPLA₂s), PLA₂s citosólicas (cPLA₂s), PLA₂s lisossomais e os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAF-AH) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

A estrutura terciária básica das PLA₂s é composta por uma região N-terminal em α -hélice (h1) – região envolvida na ligação e orientação de substratos (canal hidrofóbico das PLA₂s), uma hélice curta (*short helix*), um *loop* de ligação do íon Ca⁺², outras duas α -hélices (h2 e h3), além de uma curta folha β antiparalela (β -wing). Após a região de β -wing e a α -hélice h3 observa-se uma porção bastante flexível que compreende toda a região C-terminal destas proteínas (Figura 03). Os três últimos segmentos (α -hélices h2 e h3 e região de β -wing) contêm os resíduos que constituem o sítio catalítico (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99) das PLA₂s (ARNI; WARD, 1996; DE AZEVEDO *et al.*, 1998; WARD *et al.*, 1998).

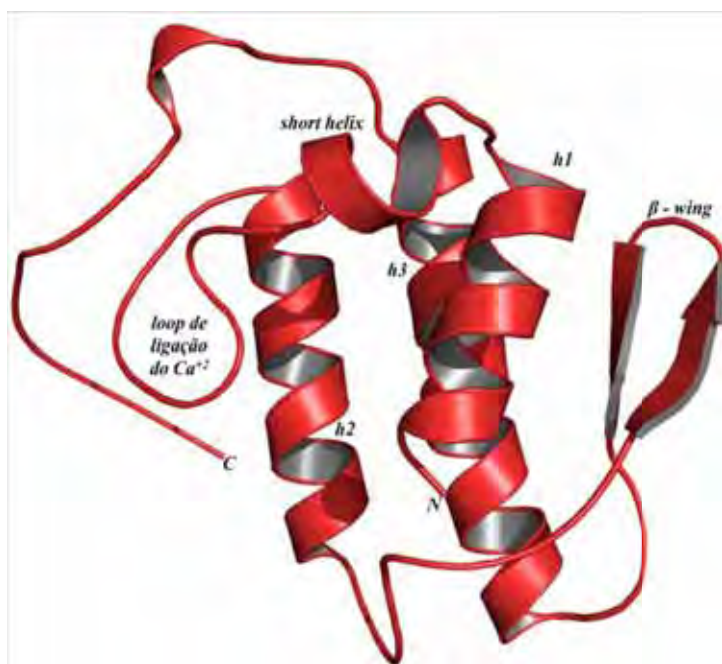


Figura 03: Enovelamento de uma PLA₂ (BmooPLA₂-I isolada do veneno de *B. moojeni*) – figura feita pelo programa PyMOL (DELANO, 2002).

PLA₂s são proteínas que possuem diferentes atividades farmacológicas, porém suas sequências de aminoácidos e enovelamento tridimensional são muito semelhantes. Devido a esta grande semelhança (40-99% de similaridade na sequência de aminoácidos), relacionar a estrutura com a função destes tipos de enzimas é um desafio a ser resolvido. A maioria destas enzimas é monomérica, no entanto, elas podem interagir com outras PLA₂s ou proteínas diferentes formando complexos que apresentam funcionalidades importantes.

1.3 – Complexos formados por Fosfolipases A₂

A oligomerização pode ser de grande importância em algumas atividades de proteínas e pode ser dependente de vários fatores como concentração e pH em que a proteína se encontra (NOOREN; THORNTON, 2003). Um fator importante para a formação de complexos é a presença de *hot spots*, que são resíduos polares que realizam contatos do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio (CLACKSON; WELLS, 1995; BOGAN; THORN, 1998; HU *et al.*, 2000). Após formados, estes complexos podem ser classificados como homodímeros (subunidades com a mesma sequência de aminoácidos) e heterodímeros (subunidades com sequências de aminoácidos diferentes) (GOODSELL; OLSON, 2000).

Proteínas complexadas podem ter suas funções melhoradas, como por exemplo a Crotoxina, onde uma subunidade auxilia na ação da outra subunidade, e também podem resultar na criação de novos sítios ativos na interfaces, além de possibilitarem um aumento na resistência à degradação e desnaturação. Além disso, a maioria dos complexos são simétricos, o que confere maior estabilidade ao conjunto como um todo (GOODSELL; OLSON, 2000). Funcionalmente, complexos formados por PLA₂s (onde PLA₂s podem interagir com outras PLA₂s ou com proteínas diferentes através de ligações covalentes e não-covalentes (Figura 04)) são de grande importância durante o envenenamento, conferindo, por exemplo, neurotoxicidade pré-sináptica (DOLEY; KINI, 2009).

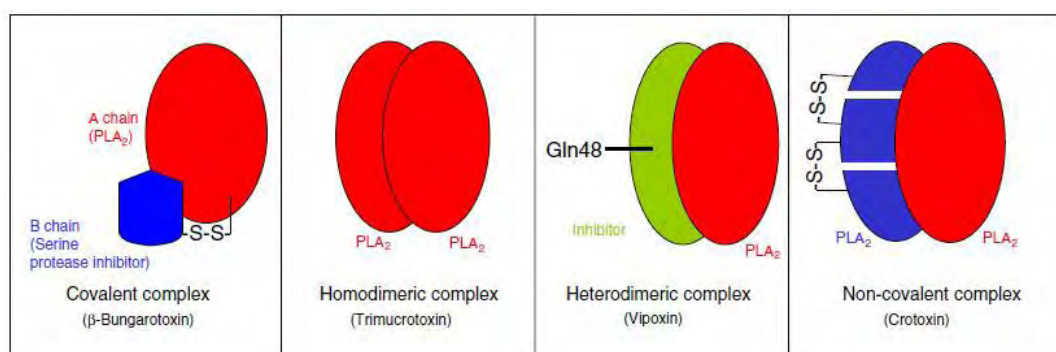


Figura 04: Representação esquemática de ligações covalentes e não covalentes entre complexos de PLA₂ de veneno de serpentes (Adaptado de DOLEY; KINI, 2009).

Como exemplos de complexos de PLA₂s, temos: i) a β-Bungarotoxina, um complexo heterodimérico isolado do veneno de *Bungarus multicinctus* (CHANG; LEE, 1963) constituído por uma PLA₂ homóloga ligada covalentemente por uma ponte dissulfeto a um inibidor de serinoproteases (KINI, 1997); ii) complexos homodiméricos como a Trimucrotoxina (toxina isolada do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (DOLEY; KINI,

2009)) e a BthTX-II (PLA₂ isolada do veneno de *B. jararacussu* (CORREA *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2011) podem ser usados como exemplos, pois são formados por duas PLA₂s com a mesma sequência de aminoácidos; iii) a Vipoxina (toxina isolada do veneno de *Vipera ammodytes meridionalis*) é um exemplo de complexo heterodimérico formado por duas moléculas (uma ácida e outra básica), onde a subunidade ácida modula a atividade tóxica da subunidade básica (BANUMATHI *et al.*, 2001); e iv) a Crotoxina (toxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*) é outro exemplo de complexo heterodimérico formado por duas PLA₂s, um componente ácido e um componente básico, onde o componente ácido tem o papel de atuar como uma chaperona em relação ao componente básico (BREITHAUPT *et al.*, 1974; HABERMANN; BREITHAUPT, 1978).

Em caso de envenenamento, alguns complexos protéicos encontrados em venenos de serpentes possuem elevada importância na ação tóxica dos mesmos, sendo em alguns casos os componentes mais letais como exemplificado acima. Portanto, é de grande importância o estudo entre as interações proteína-proteína (DOLEY; KINI, 2009).

1.4 – Outras funções de svPLA₂s

Fosfolipases A₂ dos venenos das famílias Elapidae e Viperidae são pertencentes, respectivamente, aos grupos IA e IIA/IIB com base na similaridade das sequências, das posições das pontes dissulfeto e na inserção de *loops* (SIX; DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006). As svPLA₂s pertencentes aos grupos IA e IIA possuem seis pontes dissulfeto conservadas nas duas famílias, além de duas pontes exclusivas das famílias Elapidae (ponte Cys11-Cys77) e Viperidae (Cys51-Cys133). Já as svPLA₂s classificadas no grupo IIB possuem apenas seis pontes dissulfeto, com ausência da ponte Cys61-Cys91 (ARNI; WARD, 1996; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA₂s miotóxicas da classe IIA têm sido subdivididas em dois grupos: as Asp49, cataliticamente ativas; e as Lys49, miotóxicas e cataliticamente inativas sobre substratos artificiais. A maioria das PLA₂s das serpentes do gênero *Bothrops* já descritas são proteínas básicas, com ponto isoelétrico entre 7-10, demonstrando ou não atividades catalítica, miotóxica, edematogênica e anticoagulante (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY *et al.*, 1999; PONCE-SOTO *et al.*, 2006). Por outro lado, as PLA₂s ácidas presentes nos venenos de serpentes deste gênero foram pouco estudadas e pouco se sabe sobre o mecanismo de ação destas enzimas (SERRANO *et al.*, 1999; ANDRIAIO-ESCARSO *et al.*,

2002; FULY *et al.*, 2002; COGO *et al.*, 2006; DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007). Em geral, PLA₂s ácidas de *Bothrops* não apresentam toxicidade experimental, mas induzem importantes efeitos farmacológicos como inibição da agregação plaquetária e hipotensão arterial (SERRANO *et al.*, 1999; ANDRIO-ESCARSO *et al.*, 2002; ROBERTO, KASHIMA, MARCUSSI, *et al.*, 2004; ROBERTO, KASHIMA, SOARES, *et al.*, 2004). Entretanto, algumas exceções foram descritas como uma PLA₂ de *B. alternatus* que induz hemorragia pulmonar e necrose em células do músculo cardíaco de murinos (NISENBOM *et al.*, 1986; 1988) e outra PLA₂ recentemente isolada de *B. pauloensis*, denominada Bp-PLA₂, que induz mionecrose (RODRIGUES *et al.*, 2007). Também a inflamação local é uma característica proeminente dos envenenamentos ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* (OLIVO RDO *et al.*, 2007), e seus efeitos não são completamente combatidos com os tratamentos convencionais (GUTIERREZ *et al.*, 2007).

Além disso, PLA₂s são proteínas multifuncionais capazes de participar de diversos processos fisiológicos como o remodelamento de membranas, a digestão de fosfolipídios e os mecanismos de transdução de sinais. Também se destacam por serem enzimas mediadoras de vários processos inflamatórios, podendo ser aplicadas em diversas áreas da medicina como, por exemplo, na detecção de pré-eclampsia severa, ações gerais de anestésicos, tratamento de artrites reumatóides, atuando como agentes bacteriológicos em glândulas lacrimais e outros tecidos, bloqueando a entrada de vírus dentro da célula hospedeira (uma nova classe de inibidores do HIV) e destacando-se como um potencial agente antimalária (UHL *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2004). Devido à grande importância das PLA₂s na liberação de substâncias que desencadeiam o processo inflamatório, estas enzimas são alvos de importantes estudos farmacológicos, terapêuticos e de biologia molecular estrutural, podendo ser usadas como modelos para produção de agentes anti-inflamatórios.

1.5 – Fosfolipases A₂ homólogas

O resíduo de ácido aspártico na posição 49 das PLA₂s é de grande importância para a coordenação do íon Ca⁺². Juntamente com outros aminoácidos, este resíduo é responsável pela fixação do substrato ao sítio enzimático e assim, consequentemente, pela atividade catalítica exercida por estas enzimas. Entretanto, a substituição natural de Asp49 por uma lisina, impede a coordenação do íon Ca⁺² (SCOTT *et al.*, 1990) e, ainda, o nitrogênio da

cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon Ca^{+2} , inviabilizando a ocorrência da reação catalítica (ARNI; WARD, 1996) (Figura 05).

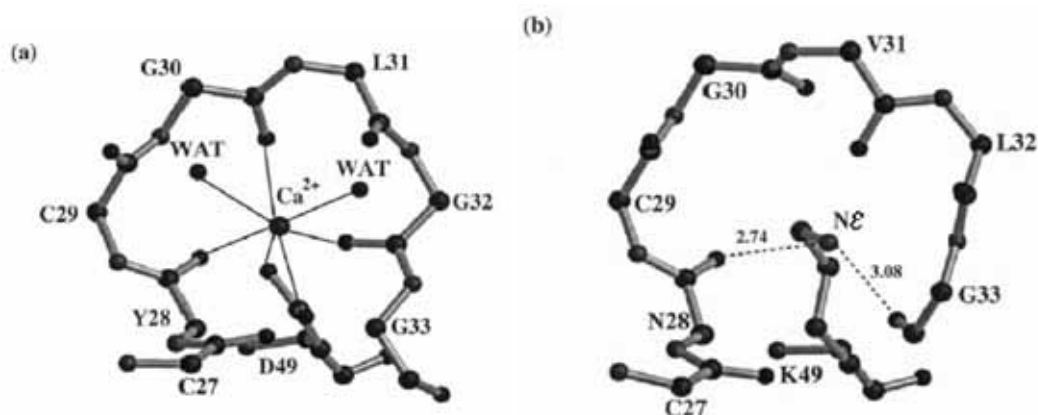


Figura 05: (a) *Loop* de ligação de Ca^{+2} de uma Asp49-PLA₂ de *Naja naja naja*. (b) Região análoga à região de ligação de Ca^{+2} da BaspTX-II (Lys49-PLA₂) do veneno de *Bothrops asper* (ARNI; WARD, 1996; WARD *et al.*, 1998).

Portanto, as Lys49-PLA₂s são consideradas PLA₂s homólogas, por não possuírem atividade catalítica detectável quando testada contra substratos lipídicos. São proteínas básicas e hidrofóbicas com alta atividade miotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LIU *et al.*, 1990; FRANCIS *et al.*, 1991; DENNIS, 1994; GUTIERREZ; LOMONTE, 1995; WARD *et al.*, 1998).

Experimentos feitos por Ward *et al.* (2002) com a BthTX-I (Lys49-PLA₂ do veneno de *B. jararacussu*), na qual o resíduo de Lys na posição 49 foi substituído pelo resíduo Asp por meio de mutagênese sítio-dirigida, demonstram que a proteína continua cataliticamente inativa, sendo assim proposto que a perda de atividade catalítica não está somente relacionada a esta substituição, mas sim a um conjunto de vários fatores estruturais, como a interação da região C-terminal com o *loop* de ligação de Ca^{+2} . Recentemente, um destes fatores estruturais foi proposto por Fernandes *et al.* (2010), onde o alinhamento de sequências dos aminoácidos do *loop* de ligação de Ca^{+2} mostrou que o resíduo Tyr28 é conservado em todas as Asp49-PLA₂s (exceto Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica) e é importante na estabilidade desta região, enquanto o resíduo Asn28 é conservado nesta região das Lys49-PLA₂s. A interação entre Tyr28-Gly35 é responsável pelo posicionamento dos átomos C_α dos resíduos Tyr28 e Gly33 nas Asp49-PLA₂s a uma distância aproximada de 4,3Å, diferentemente do que ocorre nas Lys49-PLA₂s, onde a mutação natural Tyr28Asn leva a uma maior abertura no *loop* de ligação de Ca^{+2} (cerca de 6,3 Å), inviabilizando a ligação do íon Ca^{+2} .

Apesar da pequena variação sequencial e estrutural entre elas, as PLA₂s destacam-se pelo seu grande espectro de atividades biológicas que podem ou não estar correlacionadas com sua atividade catalítica primária. Por esse motivo, é de grande importância o estudo sobre os efeitos tóxicos e farmacológicos descritos para as PLA₂s encontradas em venenos de serpentes.

1.6 – Conformação dimérica das Lys49-PLA₂s

Muitas técnicas biofísicas demonstram que as Lys49-PLA₂s são diméricas em solução (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; ARNI *et al.*, 1999; SOARES, GUERRA-SA, *et al.*, 2000; MURAKAMI *et al.*, 2007), porém ainda há uma discussão sobre qual seria a conformação do dímero biológico. Na rede cristalina das Lys49-PLA₂s é possível observar duas possibilidades de dímeros chamadas “dímero convencional” e “dímero alternativo” (Figura 06).

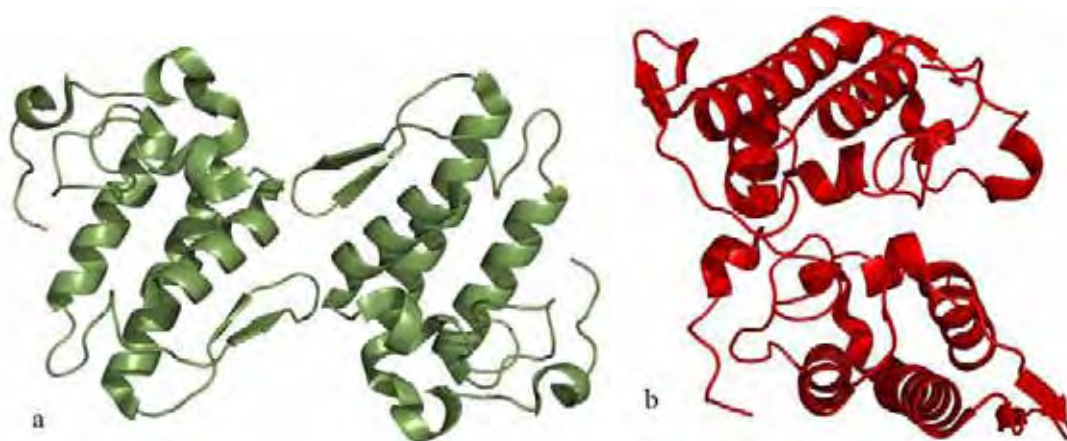


Figura 06: Representação em *cartoon* das duas possibilidades de dímeros em PLA₂s. Em (a) o dímero convencional (MjTX-II – Miotoxina II isolada do veneno de *B. moojeni* – PDB id:1XXS) e em (b) o dímero alternativo (BthTX-I – Bothropstoxina I isolada do veneno de *B. jararacussu* – PDB id: 3I3H). Figura feita usando o programa PyMOL (DELANO, 2002).

Anteriormente, as estruturas eram elucidadas na conformação convencional e após a elucidação da estrutura da BaspTX-II (toxina isolada do veneno de *B. asper*) complexada com Suramina, foi observado que esta molécula somente poderia interagir com os dois monômeros na conformação alternativa, não ficando exposta ao solvente (MURAKAMI *et al.*, 2005). Recentemente, isto também foi notado nas estruturas de BthTX-I (toxina isolada do veneno de *B. jararacussu*) e PrTX-I (toxina isolada do veneno de *B. pirajai*) complexadas com α -Tocoferol (DOS SANTOS *et al.*, 2009).

Além de estudos por SAXS (MURAKAMI *et al.*, 2007) que mostraram que a conformação alternativa é mais bem ajustada ao envelope protéico das Lys49-PLA₂, análises feitas pelo programa *online* PDBe PISA indicam que a conformação alternativa apresenta maior área de interface e melhores valores de energia livre para as interfaces hidrofóbicas, complementando os estudos de dos Santos *et al.* (2009) que propõem que as regiões responsáveis pela ação miotóxica (sítio miotóxico/C-terminal) destas toxinas se ajustam melhor na conformação alternativa.

Avanços no entendimento dos sistemas biológicos em nível molecular são possíveis através de estudos de estruturas tridimensionais pelo uso da técnica de cristalografia. Empresas farmacêuticas e químicas atuam nesta área devido ao interesse no desenvolvimento de produtos industriais, desenho de drogas baseadas em estruturas e medicamentos derivados de toxinas que auxiliam no tratamento em caso de acidentes (DRENTH, 1994; KUBINYI, 1998; SOUZA *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

A finalidade deste trabalho é o estudo de toxinas presentes no veneno da serpente *B. moojeni* em suas formas nativas pela técnica de cristalografia de raios X. Também foi realizado um estudo comparativo entre as estruturas destas toxinas com outras descritas na literatura, a fim de melhor entender a relação entre a estrutura e a função destas moléculas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Estudos estruturais

O fluxograma da Figura 07 mostra de forma rápida e simples os passos para a obtenção da estrutura final de PLA₂s isoladas do veneno de serpentes por cristalografia de raios X. Todas etapas são demonstradas no decorrer do texto.

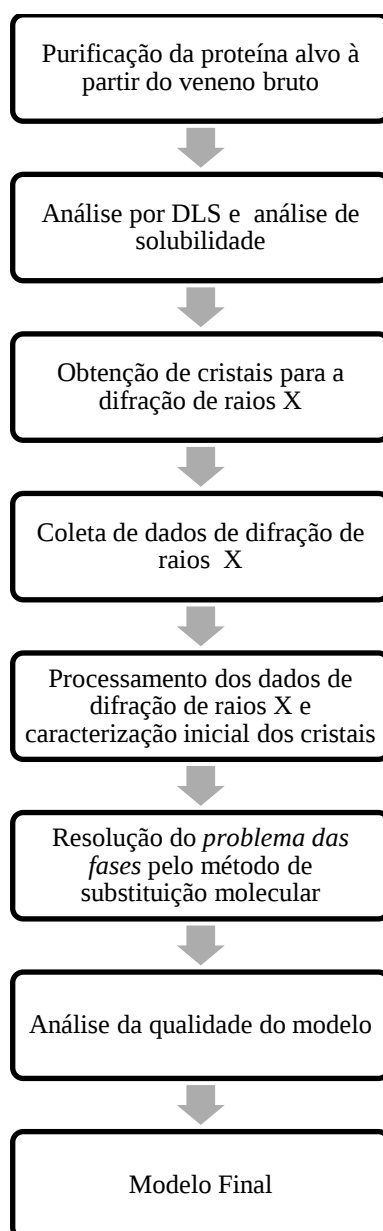


Figura 07: Fluxograma que demonstra de maneira simplificada as etapas para a resolução de uma estrutura protéica.

3.2 – Obtenção de amostras – purificação

As amostras de BmooPLA₂-I, MjTX-II e MjTX-I utilizadas na cristalização foram purificadas e cedidas pela equipe do Prof. Dr. Andreimar Martins Soares. As amostras de MjTX-I utilizadas nos estudos de DLS, cromatografia de exclusão molecular e SAXS foram purificadas em nosso laboratório pelo Msc. Carlos Alexandre H. Fernandes.

Os procedimentos de purificação das PLA₂s deste trabalho foram conduzidos à temperatura ambiente, onde os venenos brutos foram diluídos em 0,05 M de tampão bicarbonato de amônio pH 8,0 e submetidos em coluna de troca-iônica *CM-Sepharose Fast Flow* (5 mL – *GE Healthcare*) equilibrada previamente no mesmo tampão. É aplicado um gradiente linear de 0,05 M a 0,5 M de bicarbonato de amônio pH 8,0, onde as frações correspondentes a MjTX-I serão eluídas a partir do momento em que o gradiente atinge 0,15 M de tampão, e as frações correspondentes a MjTX-II são eluídas quando o gradiente 0,25 M. Este protocolo é bastante similar aos protocolos previamente publicados para a purificação de ambas proteínas (SOARES, ANDRILAO-ESCARSO, *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 1998).

A purificação da BmooPLA₂-I é iniciada da mesma maneira que as anteriores, sendo que, o pico que a contém, é eluído no início do gradiente e apresenta atividade fosfolipídica. Este pico foi liofilizado e ressuspendido em 0,01 M Tris HCl pH8,5 e 4 M NaCl e aplicado em coluna de *Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (high sub)* (0,6 x 10 cm) (*GE Healthcare*). É então aplicado um gradiente linear reverso de NaCl (4 a 0 M) seguido de injeção de H₂O na coluna, onde então ocorre a eluição da BmooPLA₂-I (SILVEIRA *et al.*, 2011 – em preparação).

3.3 – Amostras utilizadas nos experimentos

3.3.1 – BmooPLA₂-I

A BmooPLA₂-I é uma PLA₂ enzimaticamente ativa (Asp49-PLA₂), ácida e não tóxica, apresentando sequência composta por 122 aminoácidos e massa molecular estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante próxima a 14 kDa. Uma das suas atividades é a indução de edema em 68%, quando comparada com a BthA-I (PLA₂ ácida isolada do veneno de *B. jararacussu*). Também, esta PLA₂ mostrou efeito inibitório de maneira dose-dependente sobre a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, o que pode causar complicações na coagulação. Quando injetado via intra-venosa, a BmooPLA₂-I

causou a diminuição imediata da pressão arterial, sendo esse efeito causado por uma dose relativamente baixa da enzima (cerca de 30µg) (SILVEIRA, *et al.*, 2011 – em preparação).

3.3.2 – MjTX-II

A MjTX-II é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂), básica, com massa molecular em torno de 27 kDa (forma não reduzida) e sua sequência de aminoácidos é composta por 122 resíduos. O ponto isoelétrico de 8,2 é próximo do valor de outras miotoxinas, como bothropstoxinas (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) e piratoxinas (MANCUSO *et al.*, 1995), também, a toxina apresenta drástica indução de edema e necrose quando aplicada em concentração de 50 µg (SOARES *et al.*, 1998).

3.3.3 – MjTX-I

Assim como a MjTX-II, a MjTX-I é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂) que apresenta uma massa molecular de 26 kDa (forma não reduzida) estimada por SDS-PAGE. Esta proteína é composta por 121 aminoácidos ($M_r = 13,67$ - monômero, massa molecular calculada através da sequência de aminoácidos) contendo uma elevada proporção de resíduos básicos e hidrofóbicos, podendo apresentar formas diméricas, triméricas e pentaméricas quando liofilizadas, porém, em solução esta proteína é dimérica (SOARES, ANDRIO-ESCARSO, *et al.*, 2000). Os efeitos farmacológicos da MjTX-I são similares aos das demais Lys49-PLA₂, apresentando miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edema, rompimento dos lipossomos e letalidade, porém outros efeitos podem ser efetivamente observados quando a dose do veneno injetado é aumentada. A MjTX-I, na sua forma nativa, não apresenta diretamente atividades hemolíticas ou anticoagulante (SOARES, ANDRIO-ESCARSO, *et al.*, 2000).

3.4 – Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O equipamento de DLS utiliza uma microcubeta contendo solução de proteína, onde o laser é incidido (Figura 08). As moléculas em solução estão em movimento Browniano, onde em geral, as partículas menores se movimentam mais rapidamente que as partículas maiores, causando assim flutuações na intensidade da luz espalhada. Esta mudança

na intensidade da luz é medida por um detector que pode, por exemplo, estar colocado a um ângulo de 90° em relação à fonte de luz (BORGSTAHL, 2007).

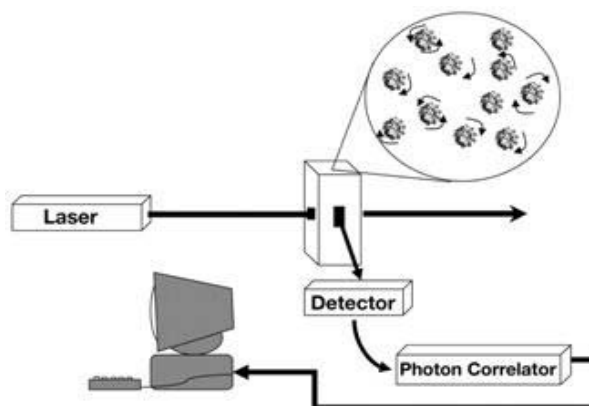


Figura 08: Esquema simplificado do experimento de espalhamento dinâmico de luz (BORGSTAHL, 2007).

A partir do coeficiente de difusão translacional (D_t), pode ser calculado o raio hidrodinâmico (R_h) das moléculas em solução, utilizando-se a relação Stokes-Einstein ($Dt = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$; onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico). A massa molecular (MW) também pode ser estimada, assumindo-se que as moléculas são esféricas ou alongadas. O equipamento de DLS também pode ser utilizado para observar as diferenças na agregação da amostra (Figura 09). Amostras monomodais monodispersas são caracterizadas por possuírem somente um tipo de molécula em somente um estado oligomérico, diferentemente das amostras polidispersas, que também se encontra moléculas do mesmo tipo, porém em outros estados oligoméricos. Amostras multimodais monodispersas se caracterizam por compreender dois ou mais tipos de moléculas em somente um estado oligomérico e amostra multimodal polidispersa é caracterizada por possuir diferentes moléculas em diferentes estados oligoméricos em sua composição (BORGSTAHL, 2007).

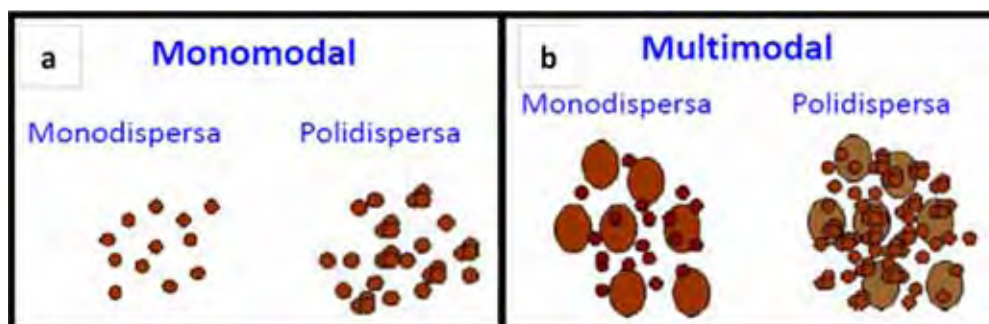


Figura 09: Diferentes tipos de agregações presentes em solução. (a) Monomodal monodispersa e polidispersa; (b) Multimodal monodispersa e polidispersa.

3.5 – Cristalização

A cristalização de moléculas em uma solução é um fenômeno de equilíbrio reversível cujos parâmetros termodinâmicos e cinéticos dependem das propriedades físico-químicas do solvente e do soluto envolvidos. Sob condições de supersaturação, o sistema é guiado para um estado de equilíbrio no qual o soluto é dividido entre as fases líquida e sólida. As moléculas perdem liberdade rotacional e translacional, diminuindo assim, a entropia do sistema e ao mesmo tempo ganham novas ligações químicas estáveis, reduzindo a energia potencial do sistema, fornecendo assim, uma força direcional para o estado ordenado (MCPHERSON, 1989; DUCRUIX; GIEGÉ, 1992). Para a determinação tridimensional de uma estrutura protéica por difração de raios X é necessário obter monocristais ordenados e regulares, onde é esperado um bom empacotamento cristalino. Devido às moléculas de proteína serem globulares e apresentarem superfícies irregulares, fica impossível um perfeito empacotamento cristalino, ocorrendo a formação de canais que são preenchidos por solventes (cerca de 20 a 80%), o que deixa os cristais extremamente frágeis (além do alto volume de solvente, ocorrem fracas interações entre as moléculas dentro da rede cristalina, como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) e de tamanho que dificilmente excede 1mm^3 (BRANDEN; TOOZE, 1991; SOUZA *et al.*, 2000).

Também é necessário fazer uma busca das melhores condições precipitantes que atuem na nucleação e no crescimento dos cristais. Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, observou-se que muitas condições de cristalização apresentavam semelhanças químicas entre si, sendo assim, proposto o *método da matriz esparsa*. Para este método foram determinados três parâmetros como variáveis principais que afetam a cristalização: pHs (tampões), aditivos (sais e/ou agentes orgânicos) e polímeros (polietileno glicol – PEG e 2-metil-2,4-pentanediol – MPD) (JANCARIK *et al.*,

1991). Pode-se assim, utilizar o processo de *salting-out*, que consiste na preparação de uma solução com agentes precipitantes (sais, polímeros ou solventes orgânicos) e proteína, e posterior aumento gradativo da concentração destes agentes até que o ponto de supersaturação da proteína seja alcançado, lembrando que em termos termodinâmicos o estado de menor energia para a proteína é o estado cristalino. O crescimento de cristais de macromoléculas biológicas é um processo de múltiplos parâmetros que envolvem três etapas principais: nucleação, crescimento e cessamento do crescimento (KOBE *et al.*, 1999). A formação de um cristal tem início a partir da associação de agregados protéicos (contatos entre as superfícies de moléculas vizinhas impulsionado por “forças de empacotamento”) originando um núcleo estável ao qual, moléculas vão se adicionando em direção à rede cristalina, promovendo o crescimento do cristal. O cessamento deste crescimento ocorrerá quando acabar as moléculas protéicas (curva de cristalização e região insaturada) da solução, onde o processo já atingiu o equilíbrio ou por variação de qualquer fator que desencadeiem este cessamento (KOBE *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2000).

A representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional (Figura 10) entre a solubilidade de uma macromolécula (mg/mL) e o agente precipitante, compreenderá duas regiões: insaturada (abaixo da curva de saturação) e supersaturada (acima da curva de saturação).



Figura 10: Representação esquemática de um diagrama de fase bidimensional da solubilidade de uma proteína (KOBE *et al.*, 1999).

A região insaturada não apresenta concentração suficiente de proteína e agente precipitante que possibilite a nucleação ou mesmo a cristalização de qualquer macromolécula.

A região de supersaturação é subdividida em zona de precipitação, zona de nucleação e zona metaestável. Em soluções extremamente concentradas, as moléculas do soluto saem da condição solúvel e passam para o estado sólido, podendo agregar-se em um precipitado amorfo ou cristalizar. Um precipitado amorfo corresponde a um mínimo de energia local e freqüentemente ocorre quando a agregação acontece muito rapidamente (zona de precipitação). Assim, a estratégia usada para induzir a cristalização de macromoléculas é conduzir lentamente para um estado de solubilidade onde possa ocorrer a nucleação (zona de nucleação) e seguir para uma solubilidade mínima até atingir o grau desejado de supersaturação (zona metaestável) ocorrendo conseqüentemente o crescimento do cristal (MCPHERSON, 1989; DUCRUIX; GIEGÉ, 1992).

Alguns parâmetros afetam a solubilidade e conseqüentemente o processo de cristalização, estes podem ser físico-químicos intrínsecos (supersaturação dos agentes, variação de temperatura, pH da solução de cristalização, força iônica, pureza das substâncias utilizadas, efeitos de densidade, pressão, viscosidade, gravidade e partículas sólidas), bioquímicos e biofísicos (presença de ligantes, aditivos específicos e degradação e/ou desnaturação da amostra), amostra protéica (contaminantes macromoleculares, heterogeneidade conformacional e concentração da amostra).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é o *método de difusão de vapor*. O princípio deste método é o processo de equilíbrio de duas soluções (uma é formada por agente precipitante com alta concentração e a outra pelo mesmo agente + proteína) através da fase de vapor, em meio fechado. A solução menos concentrada perderá seu solvente mais volátil até o potencial químico de ambas as soluções se igualar. Cristais tendem a se formar à medida que a concentração de precipitante e de proteína aumenta gradativamente (MCPHERSON, 1989; DUCRUIX; GIEGÉ, 1992).

Para o método de difusão de vapor podem ser utilizados os sistemas: *hanging drop* (“gota suspensa”) e *sitting drop* (“gota sentada”) (Figura 11, a e b).

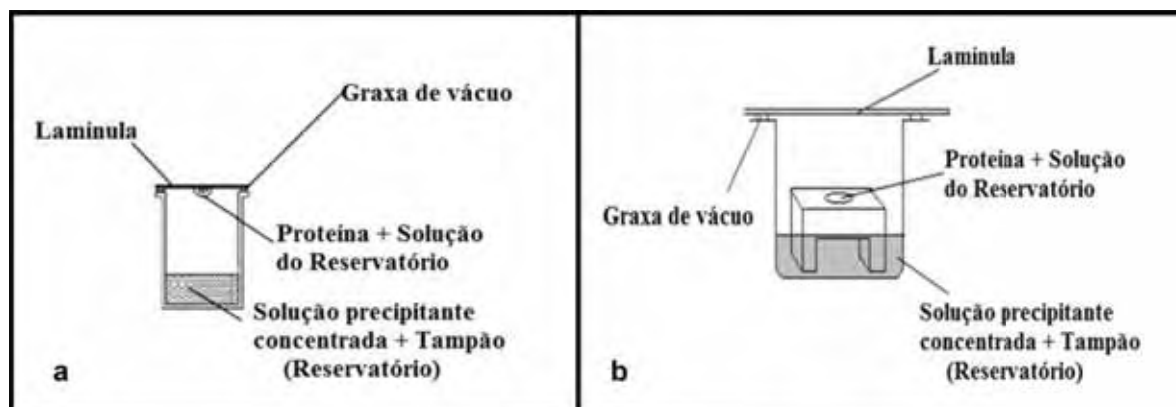


Figura 11: Método de difusão de vapor, sistemas: *a. hanging drop* e *b. sitting drop* (MCPHERSON, 1989; DUCRUIX; GIEGÉ, 1992).

No sistema *hanging drop*, a solução proteína + solução do reservatório ficam na gota suspensa e a solução precipitante com alta concentração fica no reservatório. Já no sistema *sitting drop* a gota formada pela solução de proteína + solução do reservatório fica sobre a *micro-bridge* (ponte) e a solução precipitante mais concentrada é depositada no reservatório.

3.6 – Coleta de dados de difração de Raios X

O problema experimental envolvido na determinação de estruturas cristalográficas está relacionado com a obtenção de monocristais. Um cristal é definido como sendo um composto sólido de uma variedade regular de íons ou átomos, os quais compõem as moléculas que ocorrem repetitivamente em posições específicas definidas pela rede tridimensional. A unidade básica mínima na qual um cristal pode ser reconstituído e que se repete com a mais alta simetria do cristal é a cela unitária. A unidade individual mínima que será reproduzida depois de aplicadas operações de simetria é denominada unidade assimétrica (Figura 12).

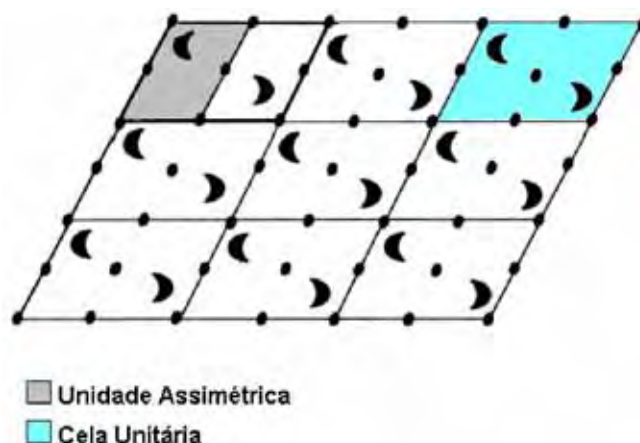


Figura 12: Representação gráfica de um cristal. O centro da célula unitária é indicado por um ponto (•) e cada molécula de proteína está representada por meias-luas (☾) (SOUZA *et al.*, 2000).

O método de coleta de dados de difração de raios X por cristais protéicos mais conhecidos e utilizados é o de roto-oscilação, onde neste tipo de coleta de dados o cristal rotaciona entre $0,5^\circ$ e $2,0^\circ$, em torno de um eixo perpendicular ao feixe de raios X (MCREE, 1993; DRENTH, 1994).

Normalmente, as coletas de dados ocorrem a temperaturas criogênicas (em torno de 100K), o que reduz os danos causados pela radiação nos cristais, assim como o decréscimo nas intensidades das reflexões, e a redução do tempo de vida do cristal. Para evitar o problema de formação de gelo durante a coleta, os cristais podem ser emergidos rapidamente em uma solução crio protetora (como glicerol por exemplo) que, na medida do possível, deve ser inócua ao cristal (MCREE, 1993). Neste tipo de coleta, a montagem dos cristais para coleta de dados é feita em um *loop* de *nylon* ao qual o cristal fica preso por tensão superficial (Figura 13 a, b e c).

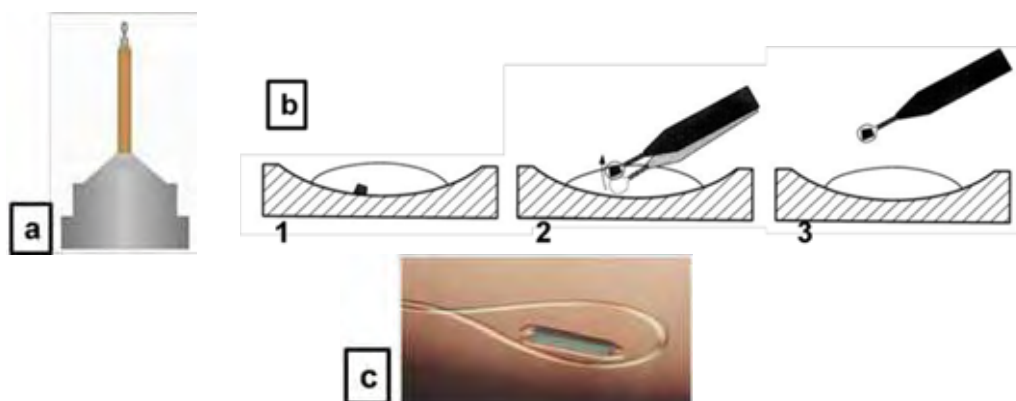


Figura 13: a. Aparato que sustenta o loop, b. Figura esquemática do modo em como o monocristal é preso ao loop, onde em (1) o cristal na gota, (2) como cristal é colocado no aparato com o loop e em (3) o cristal preso ao loop, c. detalhe do cristal preso ao loop por tensão superficial.

O *loop* montado é acoplado em uma cabeça goniométrica que possibilita a coleta, que é alinhada ao feixe de raios X para que durante o movimento de oscilação do cristal no aparelho, este fique exposto de maneira homogênea à radiação.

A coleta de dados é feita por placas de imagens, ligadas através de uma interface a uma estação gráfica onde são visualizadas as imagens difração de raios X (Figura 14). As intensidades com seus respectivos desvios padrão são os únicos dados disponíveis para a determinação da estrutura tridimensional.

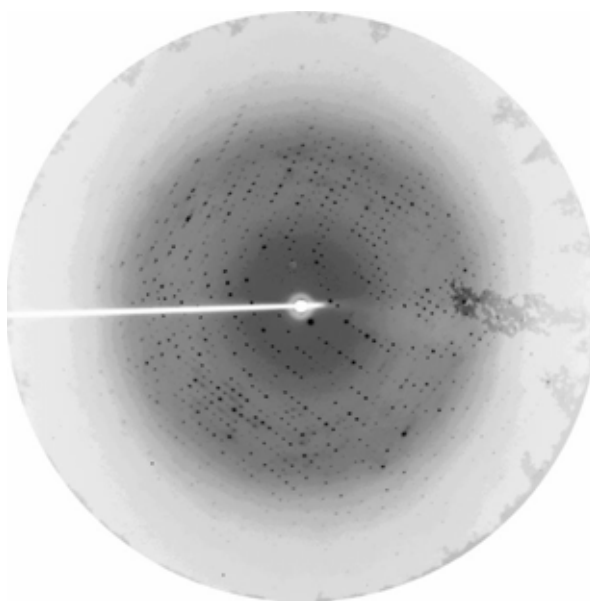


Figura 14: Imagem de difração de raios X. (Miotoxina - I do veneno de *B. moojeni*).

Os dados podem, agora, ser processados por alguns programas específicos como o *HKL2000* (OTWINOWSKI; MINOR, 1997) e *MOSFLM* (LESLIE, 1992) para obtenção das intensidades das reflexões obtidas a partir do cristal protéico que difratou pela atuação dos raios X e assim ser possível determinar algumas informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de moléculas de proteínas na unidade assimétrica e também calcular a porcentagem de água presente no cristal (MCPHERSON, 1989). Após o processamento dos dados, é gerado o mapa de densidade eletrônica, o qual será utilizado para a modelagem da estrutura da proteína.

O uso de fontes de luz síncrotron para coleta de dados levou a uma melhoria na qualidade dos dados de difração de raios X, quando comparados com uma fonte convencional. Os raios X emitidos por fontes de luz síncrotron possuem maior intensidade, menor divergência vertical e mais brilho do que os emitidos nas fontes convencionais. Estas características, quando associadas com uma coleta de dados em temperaturas criogênicas,

possibilitam a aquisição de conjuntos de dados de melhor resolução, com mais completeza, maior redundância e também reduz o tempo da coleta de imagens.

3.7 – Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura protéica

O método mais utilizado para a determinação das fases em cristalografia de proteínas é o da substituição molecular, que pode ser feita pelo programa *Molrep* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) ou algum outro programa para este fim. Este método geralmente é aplicado quando a proteína estudada apresenta homologia sequencial com outra proteína cuja estrutura é conhecida. Eventualmente, o método de substituição molecular por ser aplicado quando o enovelamento de uma proteína for similar, mesmo com valor de homologia baixo. O procedimento baseia-se no fato de proteínas com sequência de aminoácidos semelhantes possuírem enovelamentos similares (MCREE, 1993; DRENTH, 1994; WATANABE *et al.*, 2003). Neste método, a molécula de estrutura conhecida é denominada molécula modelo, a qual é posicionada na cela cristalina da estrutura desconhecida através da aplicação de funções de rotação e translação sobre o conjunto conhecido de coordenadas atômicas (GIACOVAZZO, 1992).

O modelo protéico então pode ser visualizado e refinado em programas gráficos, como, por exemplo, o programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004). Com este programa, os resíduos referentes à proteína modelo (utilizada na substituição molecular) são substituídos pela sequência da proteína a ser estudada. Adicionalmente pode ser necessário fazer deleções ou inserções no modelo. Após estes procedimentos, deve-se fazer o ajuste manual dos resíduos em relação ao mapa densidade eletrônica (calculado a partir das informações de intensidades e fases das reflexões de difração de raios X). Algumas informações experimentais e estruturais como distâncias de ligações, ângulos, ângulos diédricos, entre outras, são obtidas utilizando programas como o *CNS* (BRUNGER *et al.*, 1998) e o programa *REFMAC* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) incluso no pacote de programas *CCP4* (v.6.1.13 – The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994; POTTERTON *et al.*, 2004), que minimizam e refinam o modelo em relação aos dados experimentais. Após o refinamento é novamente avaliado e modelado no programa gráfico e novamente é refinado. E, assim, alternadamente até se obter o modelo final. O objetivo do processo de refinamento é minimizar simultaneamente a concordância do modelo atômico com os dados observados e a informação química já conhecida (KLEYWEGT, 2000).

O progresso do refinamento é avaliado por meio dos valores do R_{crist} e do R_{free} . O R_{crist} quantifica a concordância entre os fatores de estrutura observados e os calculados. Entretanto não é conveniente usar um valor baixo do R_{crist} como indicativo único de uma estrutura correta, embora um valor alto indique uma estrutura modelada incorretamente (KLEYWEGT, 2000). O valor do R_{crist} é dependente da redundância, completeza, limites de resolução e acurácia dos dados observados. Outro parâmetro calculado durante o refinamento e utilizado para a avaliação do modelo é o R_{free} (BRUNGER *et al.*, 1998). Para o seu cálculo, 5 a 10% das reflexões são retiradas aleatoriamente do conjunto de dados, não sendo usadas durante o refinamento. Desta maneira, caso a estrutura esteja sendo refinada erroneamente, o valor do R_{free} aumentará embora o R_{crist} possa apresentar um valor aceitável (KLEYWEGT, 2000).

Após o refinamento, o modelo final deve ter sua geometria avaliada por alguns programas como o *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993), e programas *online* *MolProbity* (CHEN *et al.*, 2010) e/ou *Rampage* (LOVELL *et al.*, 2003). Assim que o modelo final é analisado, este é disponibilizado em um banco de dados (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), onde poderá ser utilizado por outros pesquisadores ou empresas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os experimentos de difração de raios X foram realizados em uma das linhas de luz destinadas a estudos de cristalografia de proteínas (MX1) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas, SP.

4.1 – BmooPLA₂-I

4.1.1 – Estudos de DLS e cristalização

Amostras de BmooPLA₂-I foram submetidas a experimentos de DLS. A concentração da toxina utilizada no experimento foi de 0,5 mg/ml usando o equipamento *DynaPro TITAN* (Wyatt Technology). Os dados foram medidos 100 vezes e os resultados analisados pelo programa *DYNAMICS v.6.10* mostraram um raio hidrodinâmico de 1,8 nm, correspondendo a 100% da massa medida e um massa molecular de aproximadamente 14 kDa, equivalente a uma molécula de proteína (Figura 15).

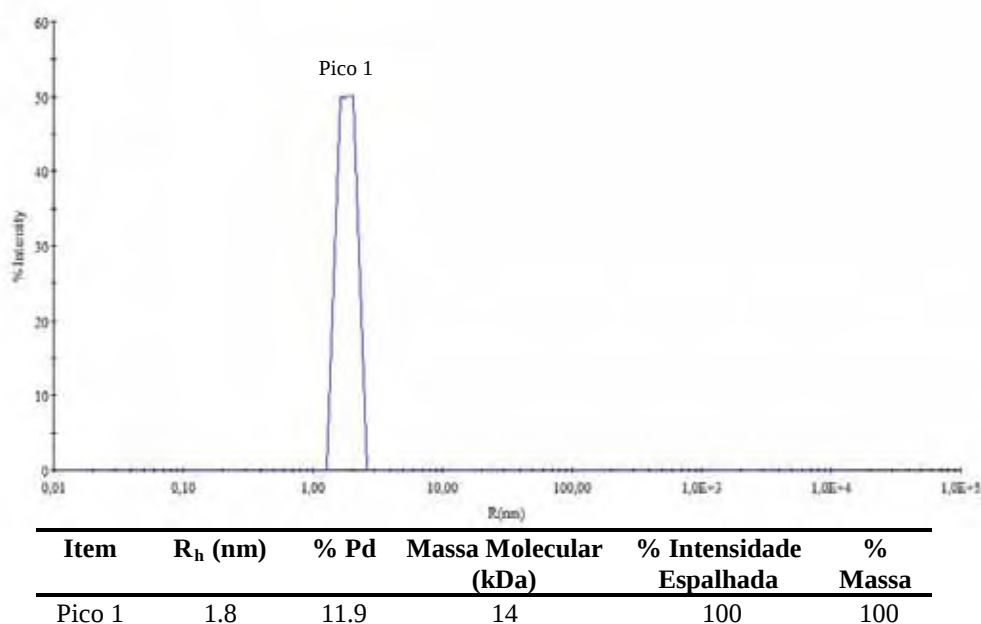


Figura 15: Gráfico de DLS da BmooPLA₂-I na temperatura de 10°C.

A seguir foram feitos experimentos de cristalização com a amostra de BmooPLA₂-I concentrada a 14 mg/mL e solubilizada em água ultra pura (MilliQ) para os testes iniciais, que foram feitos utilizando 50 soluções pré determinadas (soluções comerciais presentes no “Screen I” *Hampton Research*). Na gota havia 0,5 µL de solução de proteína e 0,5µL de solução do reservatório, montadas no sistema *hanging drop*. Após análise dos testes

iniciais, a solução de número 43 contendo 30% w/v PEG 1500 apresentou alguns cristais pequenos e outros irregulares sem arestas definidas. Após 20 dias em temperatura controlada de 18°C, cristais convenientes para estudos de difração de raios X (medidas aproximadas de 0,1 X 0,12 X 0,06 mm – Figura 16) obtidos em uma gota contendo 1 µL de solução de proteína e 1 µL de solução do reservatório previamente preenchido com 500 µL de PEG 1500 a 32% w/v.



Figura 16: Cristal de BmooPLA₂-I a 18°C após 20 dias.

Os cristais foram montados em *loop* de *nylon*, congelados em nitrogênio líquido sem crioprotetor e levados para a coleta de dados por difração de raios X, utilizando uma fonte de luz síncrotron com um comprimento de onda de 1,430Å (100K) e um detector MAR CCD (MAR Research). A distância do cristal para o detector foi de 60 mm e a oscilação do cristal de 1°, resultando em 150 imagens. Com a utilização dos pacotes de programas *HKL2000* (OTWINOWSKI; MINOR, 1997), os dados foram processados a 1,6 Å de resolução e foi observada uma molécula na unidade assimétrica. As estatísticas de processamento dos dados do cristal de BmooPLA₂-I estão descritos na Tabela 01.

Tabela 01: Estatísticas de coleta de dados e processamento da BmooPLA₂-I.

Cela Unitária (Å)	a=39,76; b=53,29; c=89,23
Grupo Espacial	C222 ₁
Resolução (Å)	50 – 1,60 (1,66 – 1,60) ^a
Reflexões Únicas	12806 (1249) ^a
Completeza (%)	99,2 (97,8) ^a
R _{merge} ^b (%)	3,3 (16,5) ^a
Linha de Luz	Síncrotron (MX1, LNLS)
Temperatura da coleta de dados (K)	100
I/σ (I)	45,38 (7,72) ^a
Redundância	5,7 (5,3) ^a
Coeficiente de Matthews V _M (Å ³ Da ⁻¹)	1,75
Moléculas na Unidade Assimétrica	1
Conteúdo de Solvente (%)	29,79

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

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

4.1.2 – Estrutura cristalográfica

Após processamento dos dados de coleta, a estrutura da BmooPLA₂-I foi elucidada pelo método de substituição molecular com o programa *Molrep* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997), sendo utilizado como modelo a estrutura da BthA-I de *B. jararacussu* (código do PDB 1ZLB – MURAKAMI *et al.*, 2006). Após um ciclo de refinamento de corpo rígido usando o programa *REFMAC* (MURSHUDOV *et al.*, 1997), a sequência de aminoácidos foi inserida e o mapa de densidade eletrônica checado. O processo de modelagem manual e a adição de moléculas de água foram feitos pelo programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004) e o processo de refinamento foi feito pelo programa *CNS* (BRUNGER *et al.*, 1998). As estatísticas de refinamento estão descritos na Tabela 02.

Tabela 02: Estatísticas de refinamento da BmooPLA₂-I.

Resolução (Å)	50 – 1,60 (1,66 – 1,60) ^a
R_{cryst}	22,52
R_{free}	24,25
Átomos não-hidrogênios	
Proteína	1048
Águas	99
B-factor Médio (Å ²) ^b	
Overall	26.85
G-factor Médio ^b	1,6

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

^b Calculado com o programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

O modelo final da estrutura da BmooPLA₂-I foi elucidado (Figura 17) e a qualidade avaliada (Figura 18) com o programa *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e *MolProbity* (CHEN *et al.*, 2010).

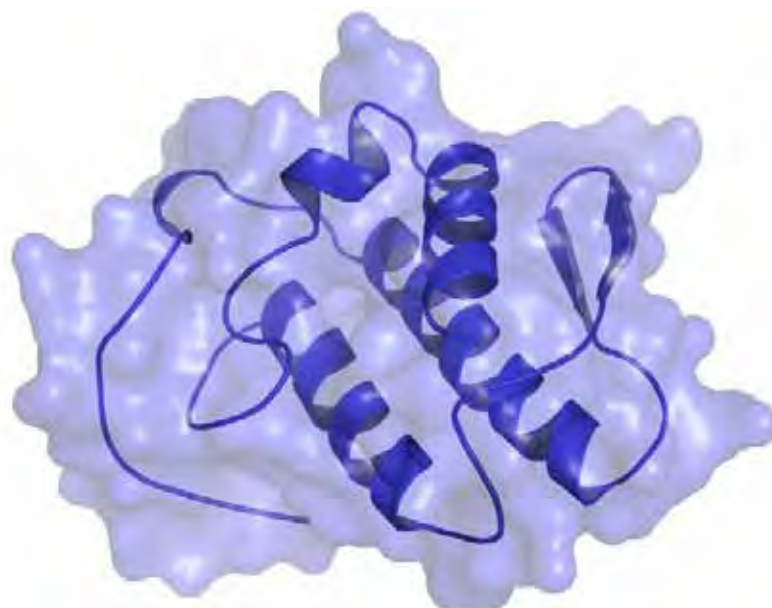


Figura 17: Estrutura final da BmooPLA₂-I. É encontrado somente uma molécula na unidade assimétrica – Figura feita pelo programa *PyMol* (DELANO, 2002).

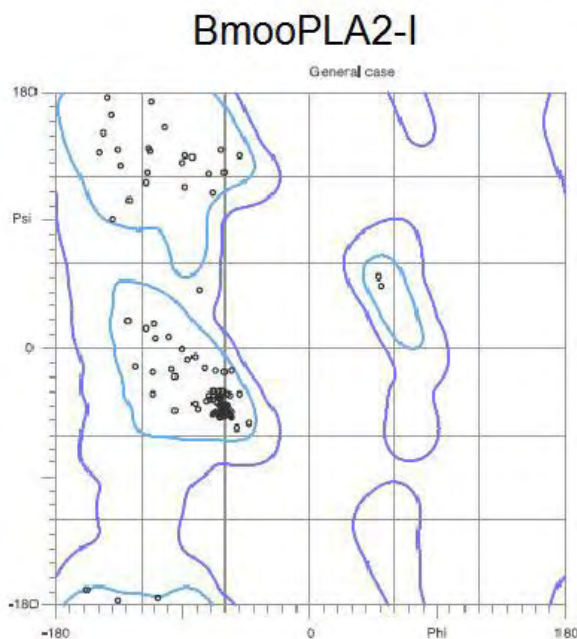


Figura 18: Gráfico de Ramachandran da estrutura final BmooPLA₂-I. A porcentagem dos resíduos na região favorável é de 95.8%, na região permitida é de 2.5% e na região não permitida é de 1.7%. Calculado com o programa online MolProbity (CHEN *et al.*, 2010).

4.1.3 – Análise estrutural

Fosfolipases A₂ que possuem efeitos em plaquetas podem ser divididas em três grupos: grupo A são PLA₂s que induzem agregação plaquetária; grupo B são PLA₂s que inibem agregação plaquetária induzidas por antagonistas fisiológicos e; grupo C são PLA₂s que possuem respostas bifásicas, possuindo efeito pró e antiagregação (KINI; EVANS, 1997).

Algumas PLA₂s isoladas de venenos de serpentes com caráter ácido como a BmooPLA₂-I (*B. moojeni*), BthA-I (*B. jararacussu* – ANDRIO-ESCARSO *et al.*, 2002), BmooTX-I (*B. moojeni* – SANTOS-FILHO *et al.*, 2008), BE-I-PLA₂ (*B. erythromelas* – DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006), BJ-PLA₂ (*B. jararaca* – SERRANO *et al.*, 1999), BpirPLA₂-I (*B. pirajai* – TEIXEIRA *et al.*, 2011) e BinTX-I (*B. insularis* – JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE; HO, 2002) (assim como a LM-PLA₂-II – toxina isolada do veneno de *Lachesis muta* (FULY *et al.*, 2002) e TJ-PLA₂ – toxina isolada do veneno de *Trimeresurus jerdonii* (LU *et al.*, 2002)), inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno (PLA₂s do grupo B). Teixeira *et al* (2011) sugerem que parte da região do C-terminal (resíduos 115-129) é responsável pela ação anti-agregação de plaquetas, comprovada por meio de experimentos realizados com peptídeos sintéticos, que, segundo os autores, reproduz a mesma atividade anti-agregação de plaquetas que a proteína intacta.

O segmento das sequências destas proteínas com caráter ácido foram alinhadas com o mesmo segmento da BaspPLA₂-II (PLA₂ isolada do veneno de *B. asper* – FERNANDEZ *et al.*, 2010) (Figura 19), onde os autores sugerem que esta proteína não possui a ação de inibição de agregação plaquetária, mas possui somente função digestiva.

	: : **
BpirPLA ₂ -I	IKYWFYGA KNCQE
BmooPLA ₂ -I	IKYWFYPA KNCQE
BthA-I	IKYWFYGA KNCQE
BinTX-I	MKYWLYGA KNCQE
BE-I-PLA ₂	NKYWFFPA KNCQE
Bj-PLA ₂	TKYWLYGA KNCQE
BaspPLA ₂ -II	SKYWFYGA KNCQE

Figura 19: Alinhamento do segmento do C-terminal sugerido por ser a região responsável pela ação de inibição de agregação plaquetária com o mesmo segmento da BaspPLA₂-II, que não possui esta função (Figura gerada pelo programa *ClustalX* - LARKIN *et al.*, 2007).

Na Figura 20, é destacada a sequência sugerida por ser a responsável pela ação de inibição de agregação plaquetária nas estruturas da BmooPLA₂-I e BthA-I (MURAKAMI *et al.*, 2006), pois somente estas duas proteínas possuem a estrutura cristalográfica elucidada.

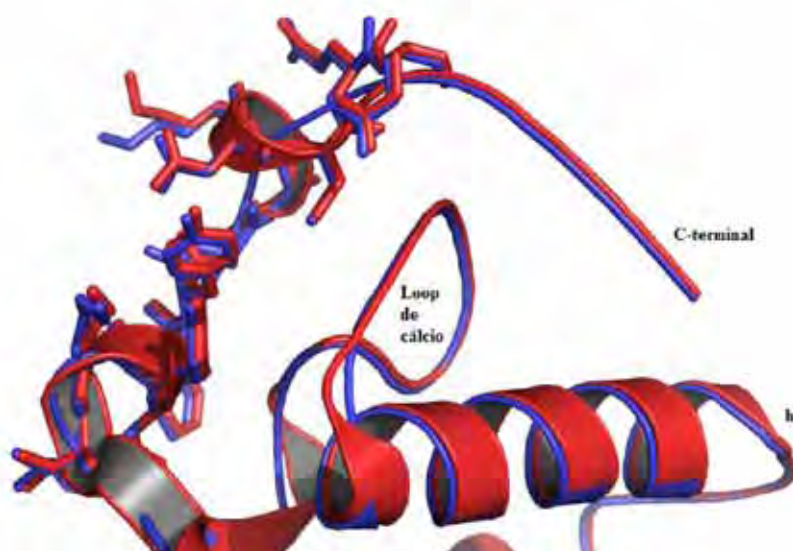


Figura 20: Região proposta para a ação de inibição de agregação plaquetária destacada em *sticks* (em azul a BmooPLA₂-I e em vermelho a BthA-I). Também está destacada as regiões do *loop* de ligação de cálcio, a hélice 2 e o C-terminal das proteínas – Figura feita pelo programa *PyMol* (DELANO, 2002).

Além desta pequena sequência, outras regiões da proteína podem interagir com estes aminoácidos, já que a BaspPLA₂-II possui o mesmo segmento, mas não possui a função de agregação plaquetária, sugerindo assim que alguns fatores estruturais podem inibir esta

ação na BaspPLA₂-II. Além disso, Teixeira *et al* (2011) afirmam que outras regiões, como o sítio ativo e o *loop* de ligação de cálcio, participam da ação de inibição de agregação plaquetária, pois esta ação é inibida quando a proteína é complexada com *p*-BPB. Na estrutura da BthA-I complexada com *p*-BPB (MAGRO *et al.*, 2005) ocorre uma distorção no *loop* de ligação de cálcio que é causada pela molécula de *p*-BPB (Figura 21), sugerindo assim que esta distorção possa causar ou inibir algumas interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos, levando a uma possível perda da atividade de inibição de agregação plaquetária da BaspPLA₂-II.

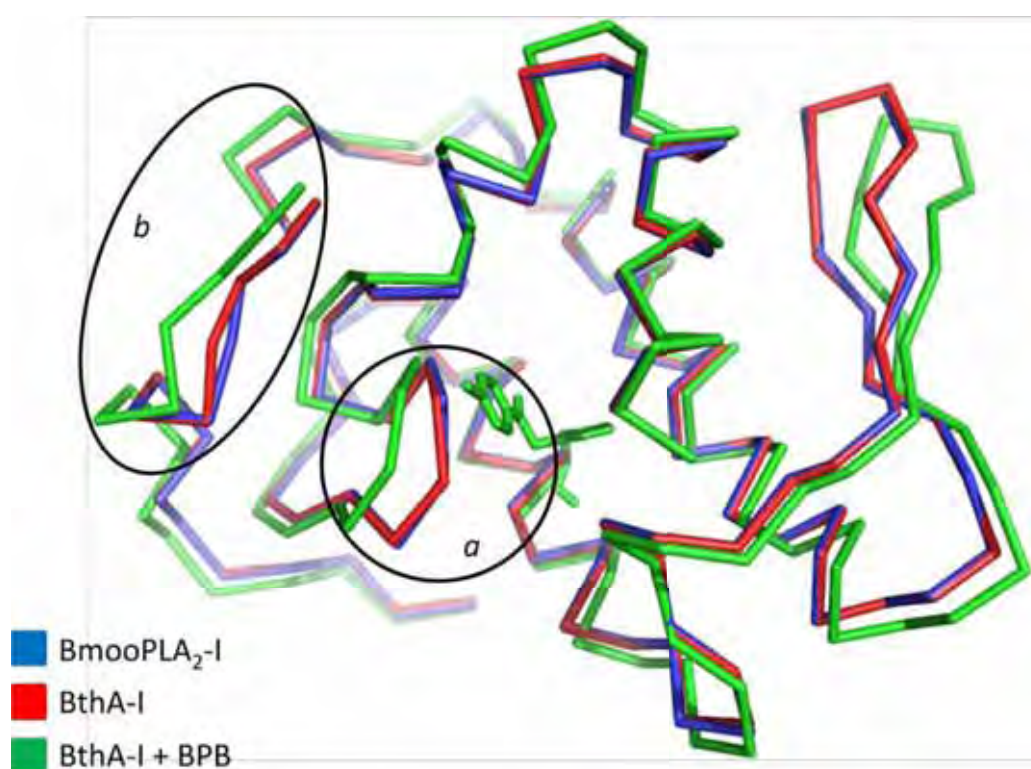


Figura 21: Sobreposição das estruturas da BmooPLA₂-I, BthA-I e BthA-I + *p*-BPB, onde a molécula de *p*-BPB ligada ao sítio ativo da molécula de proteína (a) causa uma distorção no *loop* de ligação de Ca⁺², o que causou uma distorção da região (b) dos aminoácidos sugeridos para a participação da atividade de inibição de agregação plaquetária. Figura feita pelo programa *PyMol* (DELANO, 2002)

Estas análises preliminares sugerem outros estudos focados nesta sequência de aminoácidos sugerida como responsável pela ação de inibição de agregação plaquetária e outras regiões próximas a ela, visto que há pouca variação na sequência de aminoácidos destas moléculas.

4.2 – MjTX-II

4.2.1 – Cristalização, coleta, processamento e refinamento dos dados

Estudos iniciais de cristalização da MjTX-II foram feitos utilizando as soluções descritas por Watanabe *et al* (2003), onde as soluções precipitantes eram de 0,6 - 0,8 M de citrato de sódio (pH 6,0 - 6,5), porém não houve sucesso no crescimento de cristais.

Novos testes com a proteína a 12 mg/mL solubilizada em água ultra pura (MilliQ) foram feitos pelo método de matriz esparsa com 50 soluções comerciais (“Screen I” *Hampton Research*) e gotas com 0,5 μ L de solução de proteína e 0,5 μ L de solução precipitante no sistema *hanging drop*, e assim foram observados cristais irregulares na solução de número 40 (20% w/v PEG4000, 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6 e 20% de isopropanol). A solução foi otimizada a 15% w/v PEG4000, 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6 e 15% de isopropanol, onde após 32 dias em temperatura de 18°C, em gotas com 1 μ L de solução de proteína + 1 μ L de solução precipitante, foram obtidos cristais utilizados nos estudos de difração de raios X (Figura 22).

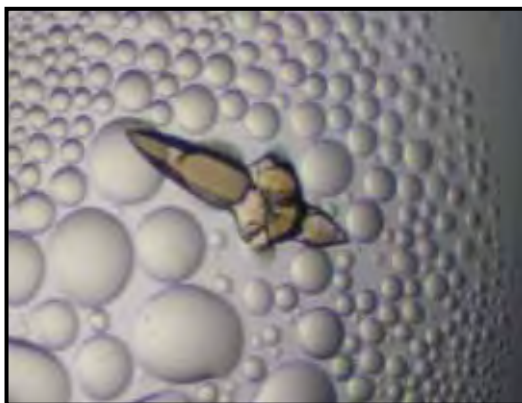


Figura 22: Cristal de MjTX-II a 18°C após 32 dias.

O cristal de MjTX-II foi montado em *loop* de *nylon* e congelado em nitrogênio líquido sem crioprotetor e levado para a coleta de dados. O comprimento de onda utilizado para os experimentos foi de 1,437 Å à temperatura de 100K, utilizando uma fonte de luz síncrotron e detector MAR CCD (*MAR Research*). A distância do cristal para o detector utilizada foi de 75 mm, com oscilação de 1°, resultando em 104 imagens. Os dados foram processados a 1,92 Å de resolução, sendo observada a presença de duas moléculas na unidade assimétrica. As estatísticas de processamento dos dados obtidos a partir do cristal de MjTX-II estão descritos na Tabela 03.

Tabela 03: Estatísticas de coleta de dados e processamento da MjTX-II.

Cela Unitária (Å)	a=49,99; b=62,16; c=86,00
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	50 – 1,92 (1,99 – 1,92) ^a
Reflexões Únicas	19571 (2036) ^a
Completeza (%)	92,4 (97,6) ^a
R _{merge} ^b (%)	11,0 (41,9) ^a
Linha de Luz	Síncrotron (MX1, LNLS)
Temperatura da coleta de dados (K)	100
I/σ (I)	10,37 (2,01) ^a
Redundância	3,9 (3,7) ^a
Coeficiente de Matthews V _M (Å ³ Da ⁻¹)	2,48
Moléculas na Unidade Assimétrica	2
Conteúdo de Solvente (%)	50,34

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

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

A elucidação da estrutura da MjTX-II (Figura 23) foi feita a partir do método de substituição molecular utilizando o programa *Molrep* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) e o modelo utilizado foi de sua estrutura complexada com ácido graxo já depositada no banco de dados (código do PDB 1XXS – WATANABE *et al.*, 2005). Executou-se um ciclo de refinamento de corpo rígido utilizando o programa *REFMAC* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) e, em seguida, foi analisada a sequência na densidade eletrônica. A modelagem manual foi feita pelo programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004). Também foram inseridas moléculas de PEG4000 e íons sulfato, que posteriormente foram refinadas com o programa *CNS* (BRUNGER *et al.*, 1998).

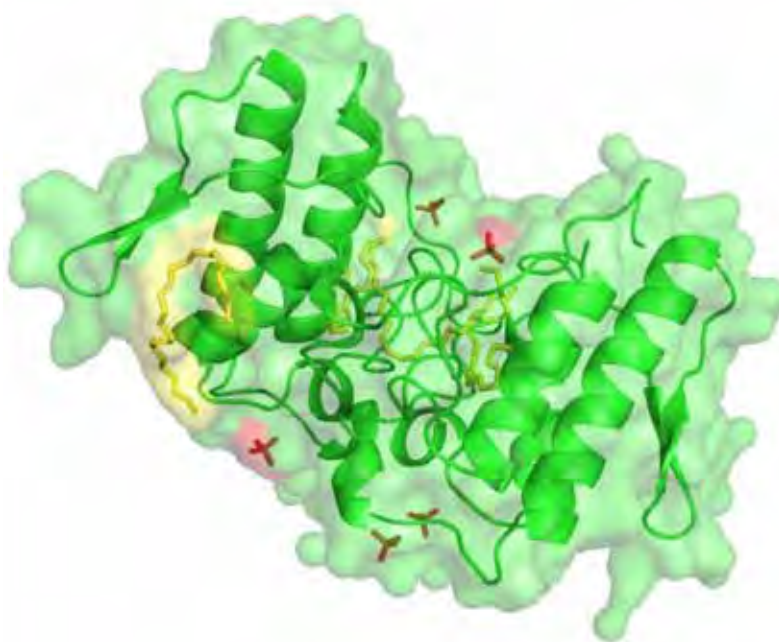


Figura 23: Estrutura final da MjTX-II. Em amarelo, moléculas de PEG4000 e em vermelho, íons sulfato – Figura feita pelo programa *PyMol* (DELANO, 2002).

As estatísticas de refinamento, assim como outras informações relacionadas à estrutura, estão descritas na Tabela 04.

Tabela 04: Estatísticas de refinamento da MjTX-II.

Resolução (Å)	50,0 – 1,92 (1,99 – 1,92) ^a
R_{cryst}	21,45
R_{free}	22,04
Átomos não-hidrogênios	
Proteína e PEG	2202
Águas	185
B-factor Médio (Å ²) ^b	
Overall	49,75
G-factor Médio ^b	0,4

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

^b Calculado com o programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

A qualidade do modelo foi avaliada com o programa *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e *MolProbity* (CHEN *et al.*, 2010) (Figura 24), sendo que o modelo apresentou boa qualidade estereoquímica, pois somente dois resíduos foram alocados em regiões não-favoráveis do gráfico.

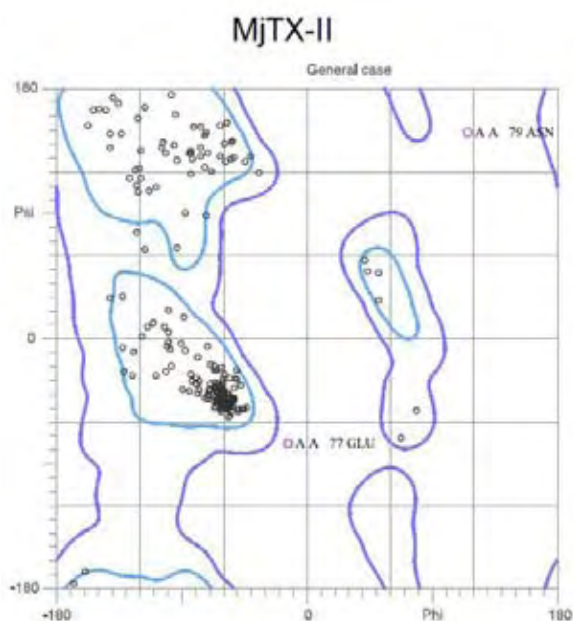


Figura 24: Gráfico de Ramachandran da estrutura final MjTX-II. A porcentagem dos resíduos na região favorável é de 94.5%, na região permitida é de 4.7% e na região não permitida é de 0.8%. Calculado com o programa online MolProbity (CHEN *et al.*, 2010).

4.2.2 – Análise estrutural

Ao sobrepor a estrutura da MjTX-II complexada com ácido esteárico com a estrutura da MjTX-II nativa, observou-se um valor baixo de desvio (r.m.s.d médio = 0,398) e foi notado que as moléculas de PEG4000 e ácido esteárico estavam próximas das mesmas regiões nas moléculas de proteína (Figura 25).

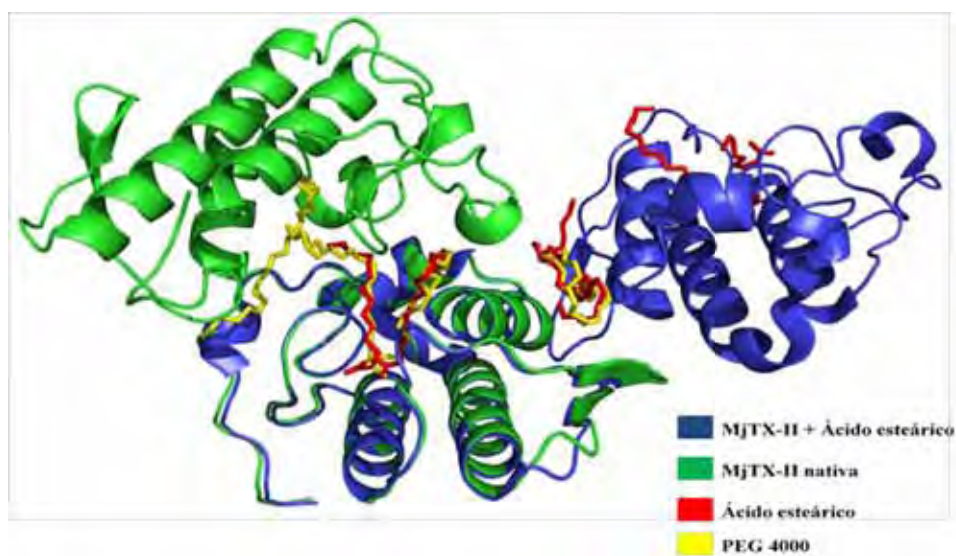


Figura 25: Sobreposição das estruturas da MjTX-II complexada (azul) e MjTX-II nativa (verde). Pode-se observar que as moléculas de ácido esteárico (vermelho) e PEG 4000 (amarelo) estão em posições semelhantes nas duas estruturas. Figura feita usando o programa PyMol (DELANO, 2002)

Ao observar as soluções precipitantes usadas na cristalização de outras Lys49-PLA₂ (Tabela 05), é notada a presença de polímeros, como PEG4000, por exemplo, exceto em duas Lys49-PLA₂ (Miotoxina II do veneno de *B. godmani* – PDB id: 1GOD e Lys49-PLA₂ de *Agkistrodon contortrix laticinctus* – PDB id: 1S8H e 1S8I). Na condição de cristalização da MjTX-II complexada com ácido esteárico, não há a presença de polímeros na condição de cristalização, porém o ácido esteárico é um polímero que pode ter a mesma propriedade do PEG4000.

Tabela 05: Soluções precipitantes das moléculas depositadas no banco de dados (PDB).

Molécula	PDB id	Solução precipitante
MjTX-II + Ácido esteárico	1XXS	Citrato de sódio
MjTX-I	3T0R	PEG 4000; Tris HCl; Cloreto de magnésio
PrTX-I	2Q2J	PEG 4000; Tris HCl; Sulfato de lítio
PrTX-I + BPB	2OK9	PEG 4000; 2-propanol; Citrato de sódio
PrTX-I + Vitamina E	3CYL	PEG 4000; Tris HCl; Sulfato de lítio
PrTX-II	1QLL	PEG 3350; Tris HCl; Sulfato de lítio
BthTX-I	3HZD	PEG 4000; Tris HCl; Sulfato de lítio
BthTX-I + PEG4000	3IQ3	PEG 4000; Tris HCl; Sulfato de lítio
mBthTX-I + BPB	3I03	PEG 4000; 2-propanol; Citrato de sódio
dBthTX-I + BPB	3HZW	PEG 4000; 2-propanol; Citrato de sódio
BthTX-I + Vitamina E	3CXI	PEG 4000; Tris HCl; Sulfato de lítio
BaspTX-II + Suramina	1Y4L	PEG 3350; 2-propanol; Citrato de sódio
BnSP-6	1PC9	PEG 6000; Cacodilado de sódio; Sulfato de amônio
BnSP-7	1PA0	PEG 6000; Cacodilato de sódio; Sulfato de amônio
BnIV	3MLM	PEG4000; Tris; Sulfato de lítio
Lys49-PLA ₂ <i>A. c. laticinctus</i>	1S8G	PEG 8000; Cacodilato; Sulfato de amônio
Lys49-PLA ₂ <i>A. acutus</i>	1MG6	PEG 4000; 2-propanol; Citrato tri-sódio
Acutohaemolysin	1MC2	PEG 4000; 2-propanol; Citrato de sódio

Este tipo de molécula pode contribuir diretamente na cristalização das Lys49-PLA₂, podendo ter a propriedade de induzir a nucleação da proteína. Além desta propriedade, segundo Fernandes *et al.* (2010) e dos Santos *et al.* (2009), as Lys49-PLA₂s possuem alta afinidade por moléculas hidrofóbicas de cadeia longa no canal hidrofóbico. Recentemente, duas regiões de ligação das Lys49-PLA₂s em membranas foram propostas: a região do sítio

ativo/canal hidrofóbico e a região do sítio miotóxico (MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2009). Fernandes *et al.* (2010) e dos Santos *et al.* (2009) propuseram que a região do canal hidrofóbico se ligaria na membrana enquanto a região do sítio miotóxico seria responsável pela desestabilização da membrana.

As estruturas da MjTX-II, MjTX-II/Ácido esteárico, PrTX-II e BthTX-I/PEG4000 foram sobrepostas e observou-se que as moléculas de ácido esteárico, ácido graxo e PEG4000 interagem na região do canal hidrofóbico, próximo aos resíduos His48 e Lys49 (Figura 26).

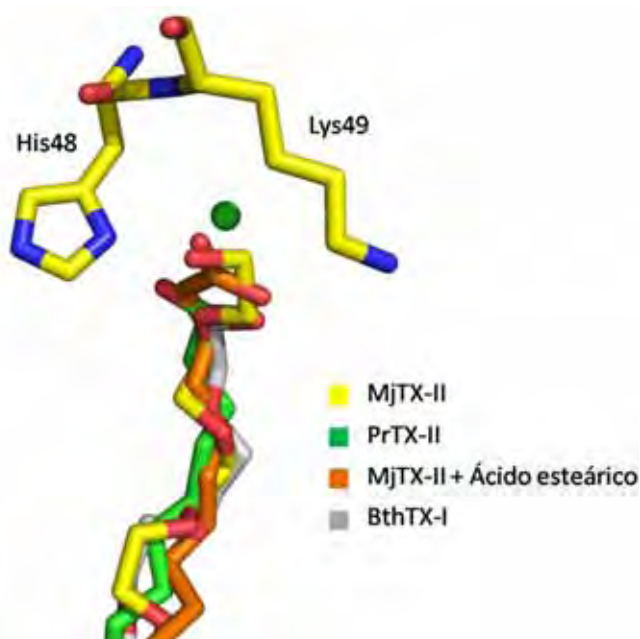


Figura 26: Sobreposição das moléculas de PEG4000 (amarelo) da MjTX-II e PEG4000 (cinza) da BthTX-I/PEG4000, ácido esteárico (alaranjado) da estrutura da MjTX-II/Ácido esteárico e ácido graxo (verde) da estrutura da PrTX-II na região do sítio ativo. Os resíduos His48 e Lys49 estão representados na forma de *sticks* e a molécula de água da estrutura da PrTX-II está representada como uma esfera verde. Figura feita com o programa *PyMol* (DELANO, 2002).

A distância das ligações de hidrogênio entre as moléculas de ácido esteárico e PEG4000 da MjTX-II são menores do que aquelas entre as moléculas de ácido graxo da PrTX-II e PEG4000 da BthTX-I, sugerindo, de acordo com Fernandes *et al.* (2009), que a molécula de ácido graxo da estrutura de PrTX-II é na verdade uma molécula de PEG3350. Tal afirmação baseia-se no fato de que a molécula de água próxima à His48 está em uma posição próxima aos oxigênios localizados nas extremidades das cadeias do ácido esteárico e PEG4000 (Figura 27).

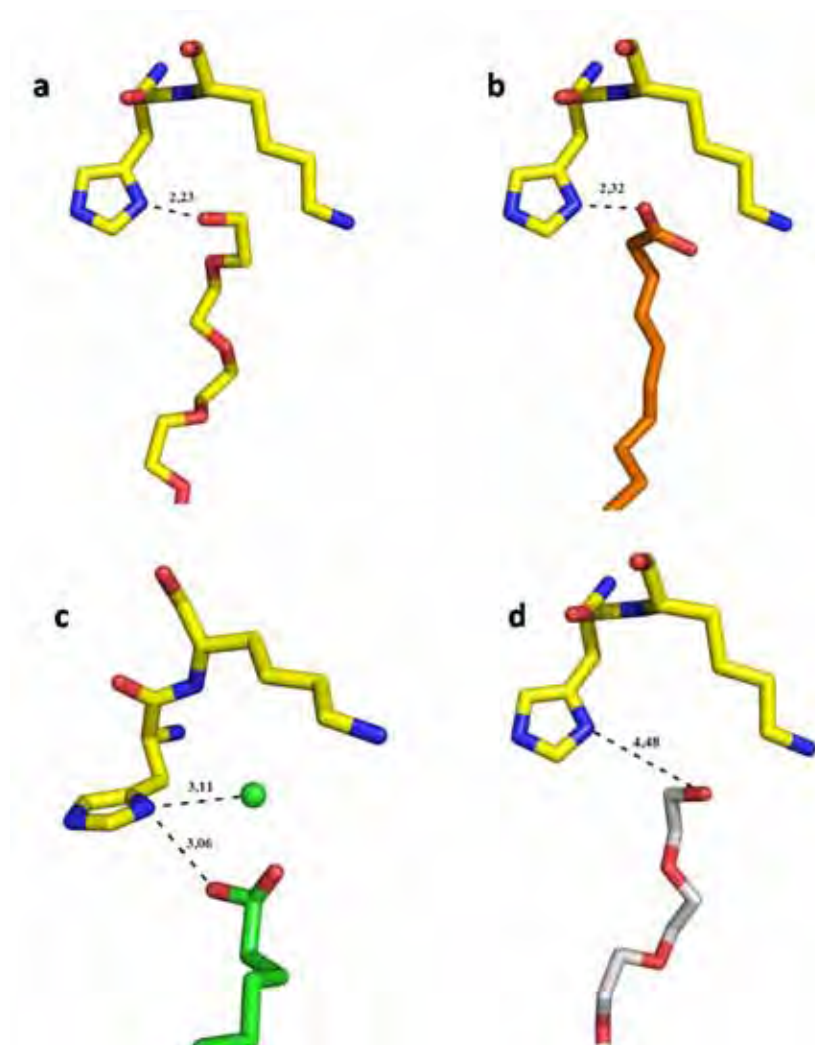


Figura 27: Distância das moléculas de (a) PEG4000 da MjTX-II, (b) ácido graxo da MjTX-II/Ácido esteárico, (c) ácido graxo da PrTX-II e (d) PEG4000 da estrutura da BthTX-I/PEG4000. Figura feita usando o programa *PyMol* (DELANO, 2002)

A distância das moléculas que estão no canal hidrofóbico nas proteínas MjTX-II e PrTX-II (molécula de ácido graxo na verdade é uma molécula de PEG3350, onde o oxigênio da ponta do PEG3350 está no mesmo local que a água) são menores (média de 2,68Å) quando comparadas com a distância da molécula de PEG4000 da BthTX-I (4,48Å). Estas moléculas que possuem distância menor entre as moléculas hidrofóbicas em relação a His48 da MjTX-II possuem os resíduos Cys29 e Gly30 hiperpolarizados pela Lys122 (Figura 28), o que torna o C-terminal destas proteínas mais expostos, oferecendo assim mais contatos eletrostáticos entre as proteínas e as membranas (AMBROSIO *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que o motivo da hiperpolarização da ligação peptídica dos resíduos Cys29/Gly30 não é somente pela presença de uma molécula hidrofóbica de cadeia longa no canal hidrofóbico, mas também devido à formação de uma ligação de hidrogênio entre o Nδ1 da His48 e o oxigênio desta molécula de cadeia longa.



Figura 28: Posições das cadeias laterais dos resíduos de Lys122 em ligação peptídica com Cys29 e Gly30. A orientação deste resíduo na MjTX-II, MjTX-II + Ácido esteárico e PrTX-II é semelhante, diferentemente da BthTX-I – Programa *PyMol* (DELANO, 2002)

Estes dados reforçam a teoria anteriormente apresentada por Fernandes *et al.*, 2009, que propõe que a verdadeira função da Lys122 não seria interromper a atividade catalítica das Lys49-PLA₂s, mas sim participar da estabilização proteína/membrana. Como já proposto por Ambrosio *et al.* (2005), a hiperpolarização da Cys29/Gly30 provocada pela Lys122 aumentaria a exposição de resíduos hidrofóbicos da porção C-terminal, favorecendo a os contatos eletrostáticos entre a proteína (porção C-terminal) e a membrana, possibilitando que o sítio miotóxico (DOS SANTOS *et al.*, 2009) desestabilize a membrana celular.

4.3 – MjTX-I

4.3.1 – Cristalização, coleta e processamento dos dados

A amostra liofilizada de MjTX-I foi dissolvida em água ultra-pura em concentração de 12 mg/mL. Os experimentos de cristalização foram feitos pelo método de matriz esparsa (JANCARIK *et al.*, 2001) e pela técnica de difusão de vapor (MCPHERSON, 1989) onde na gota havia 1 µl de solução de proteína e 1 µl de solução do reservatório e no reservatório havia 500µl de solução precipitante. Após aproximadamente 350 dias, a 18°C, foram obtidos cristais convenientes para a coleta de dados (Figura 29) em solução contendo 0,15 M MgCl₂, 32% w/v PEG4000 e 0,1 M Tris HCl pH8,5, assim como descrito por Marchi-Salvador *et al* (2005).



Figura 29: Monocristais de MjTX-I a 18°C.

O cristal foi colocado em *loop* de *nylon* e congelado em nitrogênio líquido a 100K para evitar danos causados pela radiação e levado ao LNLS para coleta de dados de difração, utilizando o comprimento de onda de 1,421 Å e placa de imagem MAR CCD (MAR Research). A distância utilizada entre o *loop* e o detector era de 80 mm e a oscilação do cristal de 1°. O conjunto de dados composto por 150 imagens foi processado a 2,5 Å de resolução pelo programa *HKL2000* (OTWINOWSKI; MINOR, 1997). Os dados de difração e processamento estão descritos na Tabela 06.

Tabela 06: Estatísticas de coleta de dados e processamento da MjTX-I.

Cela Unitária (Å)	a=57,59; b=125,85; c=65,33; β=105,91
Grupo Espacial	C2
Resolução (Å)	33,44 – 2,49 (2,55 – 2,49) ^a
Reflexões Únicas	15300 (1541) ^a
Completeza (%)	98,0 (98,9) ^a
R _{merge} ^b (%)	5,7 (22,0) ^a
Linha de Luz	Síncrotron (MX1, LNLS)
Temperatura da coleta de dados (K)	100
I/σ (I)	20,64 (4,69) ^a
Redundância	3,1 (3,1) ^a
Coefficiente de Matthews V _M (Å ³ Da ⁻¹)	2,12
Moléculas na Unidade Assimétrica	4

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

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

4.3.1.1 – Determinação da estrutura, refinamento e análise estrutural

A estrutura da MjTX-I foi determinada por substituição molecular, utilizando o programa *Molrep* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) utilizando as coordenadas do monômero A da PrTX-II (PDBid: 1QLL – LEE *et al.*, 2001) como modelo inicial. Após um ciclo de refinamento de corpo rígido (programa *CNS* – BRUNGER *et al.*, 1998), os aminoácidos da sequência da MjTX-I foram inseridos e o mapa de densidade eletrônica foi gerado. O processo de modelagem manual, inserção de moléculas de água e PEG4000 foram feitos pelo programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004) e o processo de refinamento foi feito com o programa *CNS* (BRUNGER *et al.*, 1998). Assim como já caracterizado em outras estruturas elucidadas de Lys49-PLA₂, o modelo cristalográfico da MjTX-I (Figura 30) apresenta em cada monômero sete pontes dissulfeto e os componentes clássicos de estrutura secundária.



Figura 30: Estrutura final da MjTX-I. Em amarelo, moléculas de PEG4000. Devido a falta de densidade eletrônica, algumas cadeias laterais e aminoácidos inteiros foram cortados – Programa *PyMol* (DELANO, 2002).

Devido a falta de densidade eletrônica em algumas regiões, algumas cadeias laterais de alguns aminoácidos foram removidas: monômero A: Lys53, Lys69, Lys93, Lys115, Lys116, e Lys122; monômero B: Lys16, Lys20, Lys36, Lys57, Lys69, Lys70, Asp76, Lys78, Glu87, Asn88, Lys116, Val119, Lys122, e Arg131; monômero C: Lys16,

Lys20, Lys36, Lys69, Lys70, Lys 78, Lys93, Lys115, Lys116, e Lys129; monômero D: Lys7, Gln11, Lys16, Lys20, Lys57, Leu58, Lys69, Lys70, Tyr73, Asp76, Glu86, Asn88, Lys115, e Phe125. Pelo mesmo motivo, alguns aminoácidos foram completamente removidos como Val119, Tyr120, Leu121, e Lys122 do monômero C e Asp118, Val119, Tyr120, Leu121, e Lys122 do monômero D. As estatísticas de refinamento e outras informações estão dispostos na Tabela 07. As coordenadas da MjTX-I foram depositadas no banco de dados (*RCSB Protein Data Bank*) com o código de acesso 3T0R.

Tabela 07: Estatísticas de refinamento da MjTX-I.

Resolução (Å)	33,44 – 2,49 (2,55 – 2,49) ^a
R_{cryst}	25,13
R_{free}	26,27
Átomos não-hidrogênios	
Proteína	3544
Águas	113
PEG4000	56
B -factor Médio (Å ²) ^b	
Geral	50,89
Gráfico de Ramachandram (%) ^c	
Resíduos em região favorável	95,1
Resíduos em região não-favorável	1,8

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

^b Calculado pelo programa CNS.

^c Calculado pelo programa MolProbity.

Para análise da qualidade do modelo, foi utilizado o programa *online* MolProbity (CHEN *et al.*, 2010). A qualidade estereoquímica do modelo final da MjTX-I é satisfatória, onde no gráfico de Ramachandran pode-se observar 95,1% de resíduos em região favorável. Somente os resíduos Glu87 e Phe125 (monômero B), Leu58, Lys116 e Phe125 (monômero D) estão alocados nas regiões desfavoráveis, o que corresponde somente a 1,8% do total de aminoácidos (Figura 31).

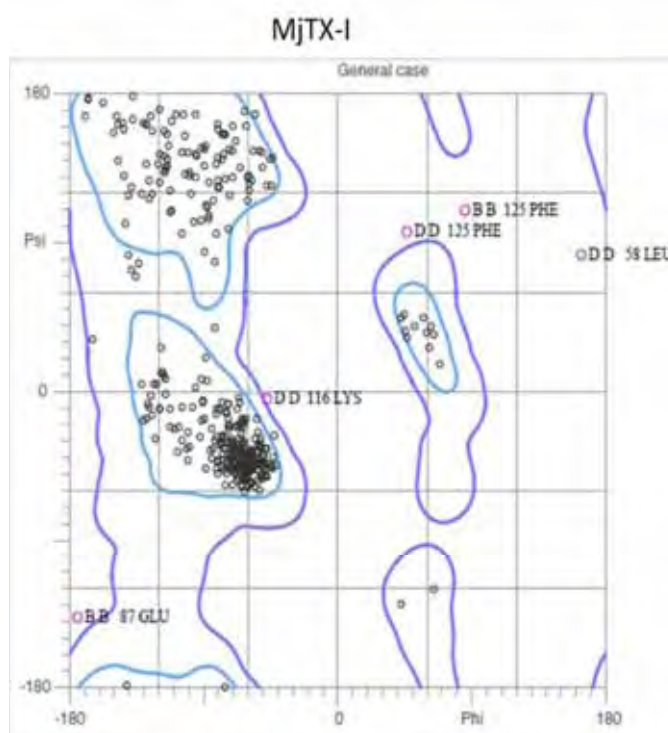


Figura 31: Gráfico de Ramachandran da estrutura final MjTX-I. A porcentagem dos resíduos na região favorável é de 95.1% e 1,8% dos resíduos estão em região não-favorável. Figura e valores calculados com o programa online MolProbity (CHEN *et al.*, 2010).

Quando melhor analisada, a unidade assimétrica apresenta os monômeros dispostos de modo que as regiões de β -wings fiquem do lado interno do oligômero, fazendo assim com que os resíduos do C-terminal apontem para o lado externo. Outra observação foi que, ao sobrepor as estruturas, o desvio r.m.s.d do monômero D em relação aos outros monômeros ficou em torno de 0,55 Å, sendo que o maior é observado na região próxima à β -wing, que é a região dos monômeros que mais interagem entre si. De acordo com o programa online PDBe PISA, os contatos da interface entre monômeros A/B são compostos por oito ligações de hidrogênio e quatro pontes salinas, e os contatos da interface entre os monômeros C/D são uma ligação de hidrogênio e três pontes salinas. A lista dos resíduos envolvidos e o tipo de interação estão dispostos na Tabela 08.

Tabela 08: Lista de resíduos envolvidos nos contatos, como ligações de hidrogênio e pontes salinas, entre os monômeros A/B e C/D.

Tipo de interação	Resíduos/átomos envolvidos	Distância (Å)
Ligações de Hidrogênio	A: Gln11 [O]; B: Trp77 [NE1]	2,77
	A: Glu12 [OE2]; B: Lys80 [NZ]	2,71
	A: Glu12 [O]; B: Trp77 [NE1]	3,56
	A: Lys80 [O]; B: Lys80 [NZ]	2,76
	A: Trp77 [NE1]; B: Gln11[O]	3,13
	A: Lys80 [NZ]; B: Glu12 [OE2]	2,60
	A: Trp77 [NE1]; B: Glu12[O]	3,48
	A: Lys80 [NZ]; B: Lys80 [O]	2,66
	C: Trp77 [NE1]; D: Gln11[O]	2,95
Pontes salinas	A: Glu12 [OE1]; B: Lys80 [NZ]	3,47
	A: Glu12 [OE2]; B: Lys80 [NZ]	2,71
	A: Lys80 [NZ]; B: Glu12 [OE1]	3,21
	A: Lys80 [NZ]; B: Glu12 [OE2]	2,60
	C: Glu12 [OE1]; D: Lys80 [NZ]	2,88
	C: Glu12 [OE2]; D: Lys80 [NZ]	2,39
	C: Lys80 [NZ]; D: Glu12 [OE2]	3,70

Outro fator para o menor número de contatos entre os pares é a presença da molécula de PEG4000 na interface dos monômeros A/B. Os contatos hidrofóbicos adicionais formados pelo ligante podem auxiliar nas interações entre os monômeros, aumentando o número de contatos da interface, o que não acontece na interface dos monômeros C/D, onde somente ocorre interação entre as regiões das β -wings dos monômeros.

A disposição das moléculas na unidade assimétrica da MjTX-I se assemelha a dois dímeros convencionais e inicialmente houve a tentativa de relacionar esta conformação com a que seria encontrada biologicamente utilizando o programa *online* PDBe PISA, porém os resultados gerados não sugeriram que a conformação encontrada no cristal seria a unidade biológica, e sim a conformação monomérica. Como os contatos entre as interfaces A/B e C/D são de grande importância (como as ligações de hidrogênio e pontes salinas), pode-se considerar que este arranjo molecular na unidade assimétrica não é um simples artefato de cristalização e possui, portanto, alguma significância biológica. Este fato é corroborado pelo

grande número de Lys49-PLA₂ diméricas depositadas no PDB quando comparado às monoméricas.

Outro fator observado é a ausência de alguns resíduos do sítio miotóxico proposto por dos Santos *et al* (2009), já que na MjTX-I somente os resíduos Lys20 e Lys115 são conservados, enquanto os resíduos Arg118 e Tyr119 são naturalmente substituídos, respectivamente, pelos resíduos Asp118 e Val119, como mostrado nas Figura 32 e 33. No mesmo trabalho, dos Santos *et al* (2009) sugerem que os resíduos Lys80 e Lys127 são também importantes para a atividade miotóxica, contudo o segundo também não é conservado na sequência da MjTX-I (Figuras 32 e 33).

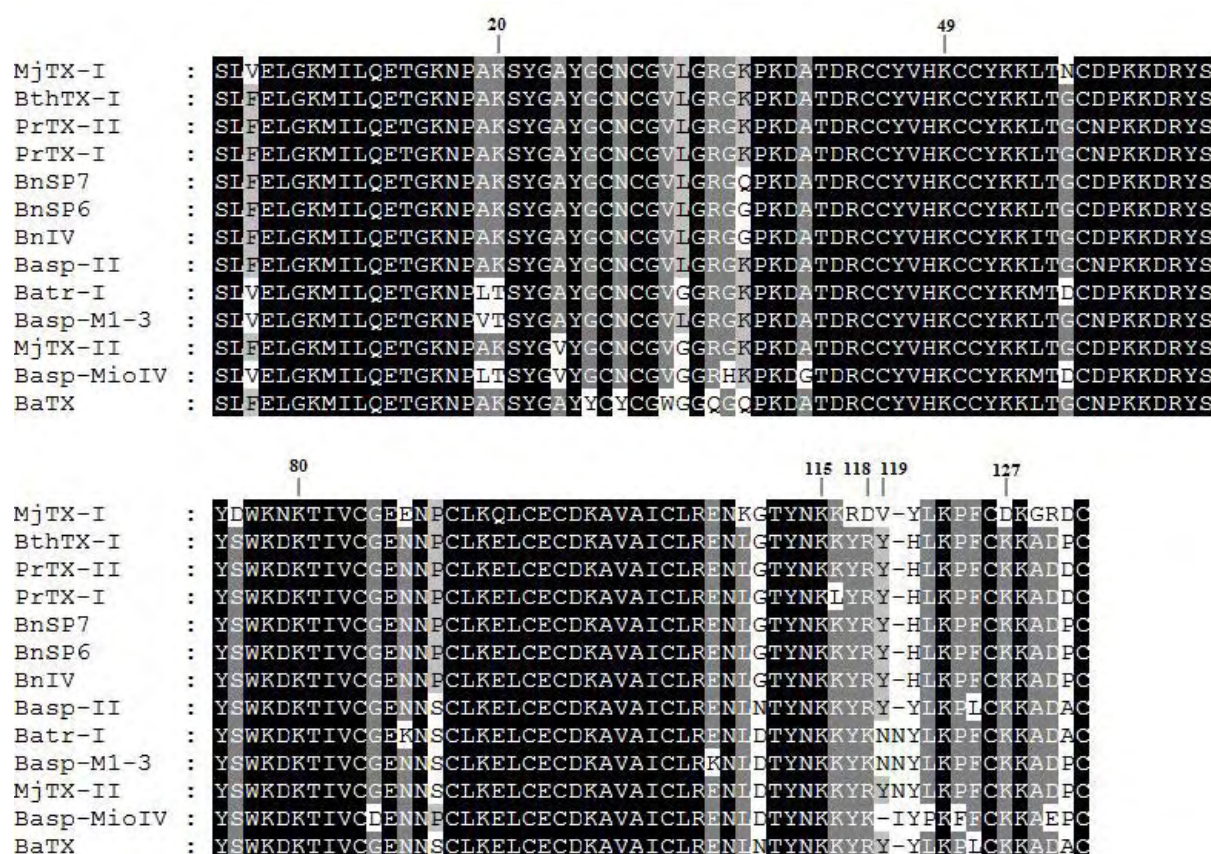


Figura 32: Alinhamento da MjTX-I com outras Lys49-PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops*. Estão em destaque os resíduos do sítio miotóxico 20, 115, 118 e 119, e do sítio secundário 20 e 127.



Figura 33: (a) Local do sítio miotóxico na estrutura da PrTX-I (azul) e os resíduos 20, 115, 118 e 119 estão destacados em amarelo. (b) A mesma região na estrutura da MjTX-I (verde) com os mesmos resíduos destacados em vermelho. (c) Sobreposição das estruturas da PrTX-I e MjTX-I e os resíduos do sítio secundário destacados na cor alaranjado. Figura feita pelo programa *PyMol* (DELANO, 2002).

A ação miotóxica da MjTX-I pode, portanto, ser diferenciada e não dependente do sítio miotóxico já proposto. Além disso, a MjTX-I está na conformação semelhante à convencional, o que contraria o mecanismo miotóxico proposto, que baseia-se na conformação alternativa.

A fim de investigar a diferença da conformação oligomérica da MjTX-I em comparação com outras Lys49-PLA₂, técnicas experimentais em solução foram adotadas, como espalhamento dinâmico de luz (DLS), cromatografia de exclusão molecular e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

4.3.2 – Espalhamento dinâmico de luz

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram feitos pelo Msc. Carlos A. H. Fernandes. A concentração da MjTX-I utilizada foi de 1,5mg/mL a 18°C usando o equipamento *DynaPro TITAN* (Wyatt Technology). As medidas foram executadas com a

proteína diluída em água ultra pura e Tris HCl pH 8,0 nas concentrações de 0,5, 2,0, 10,0 e 20,0mM. Foram realizadas medidas para cada experimento imediatamente após incubação e duas horas de intervalo (os valores obtidos são mostrados na Figura 34). Os dados foram analisados usando o programa *DYNAMICS* v.6.10 (Wyatt Technology).

		R (nm)	MW –R (kDa)	% Pd	% Massa	
Nativa (H ₂ O)		2,1	19	16,5	99,6	●
[Tris HCl]	0,5 mM	2,1	19	19,3	99,4	●
	0,5 mM*	2,7	33	37,6	99,8	●● ?
	2,0 mM	1,9	15	17,6	99,8	●
	2,0 mM*	2,8	37	32,3	99,3	●● ?
	10 mM	1,9	15	15,8	99,8	●
	10 mM*	2,8	37	28,6	99,8	●● ?
	20 mM	3,7	71	25,3	97,6	●●●●

*Após duas horas de incubação

Figura 34: Dados de DLS obtidos a partir de experimentos onde a toxina foi diluída em água e em Tris HCl pH8,0. Os dados calculados são aproximados, onde um círculo corresponde a um monômero, dois círculos correspondem a duas moléculas e quatro círculos correspondem a quatro moléculas ou mais.

A partir dos resultados dos experimentos de DLS é possível observar que a toxina solubilizada em água ultra-pura adota a conformação monomérica, assim como nas concentrações de Tris HCl de 0,5 mM, 2,0 mM e 10 mM. Porém, nestas mesmas concentrações, após duas horas de incubação, observam-se outros estados oligoméricos. Assim, não é possível determinar se o estado dimérico é predominante, visto que os valores de polidispersidade são altos. Na concentração de 20mM, a toxina apresenta conformação oligomérica próxima a um tetrâmero, porém o valor de polidispersidade também é alto. Para o cálculo dos estados oligoméricos, a massa utilizada foi calculada a partir da sequência de aminoácidos (13,67kDa).

4.3.3 – Cromatografia de exclusão molecular

O experimento de cromatografia de exclusão molecular foi realizado pelo Msc. Carlos A. H. Fernandes. O experimento foi feito com 0,1mL de amostra de MjTX-I purificada

e com concentração de 2 mg/mL utilizando coluna *Superdex 75 10/300 GL* (GE Healthcare) equilibrada com 20mM Tris HCl pH8,0 a 20°C, com fluxo de 0,5mL/min (Figura 35a). As massas moleculares padrões foram obtidas com o *kit* de calibração de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich), o qual contém: *blue* dextran (2000kDa), albumina de soro bovino (66kDa), anidrase carbônica (29kDa), citocromo C (12,4kDa) e aprotinina (6,5kDa). Os volumes de retenção para cada padrão e amostra foram mensurados e calculados a partir do coeficiente de partição (K_{av}), que é definido pela fórmula $K_{av} = (V_r - V_0)/(V_c - V_0)$, onde V_r é o volume de retenção, V_0 é o volume nulo (calculado baseado no volume de retenção do padrão *blue* dextran) e V_c é o volume necessário para ocupar toda a coluna. O coeficiente K_{av} de cada padrão foi colocado no gráfico pelo *log* da massa molecular a fim de gerar a curva padrão (Figura 35b), usada para a determinação da massa molecular aproximada de cada estado oligomérico encontrados na amostra. Os volumes eluídos foram submetidos a eletroforese em gel de Poliacrilamida (13% SDS PAGE) (Figura 35c), demonstrando que as bandas obtidas apresentaram uma massa molecular similar àquela da MjTX-I (cerca de 15kDa).

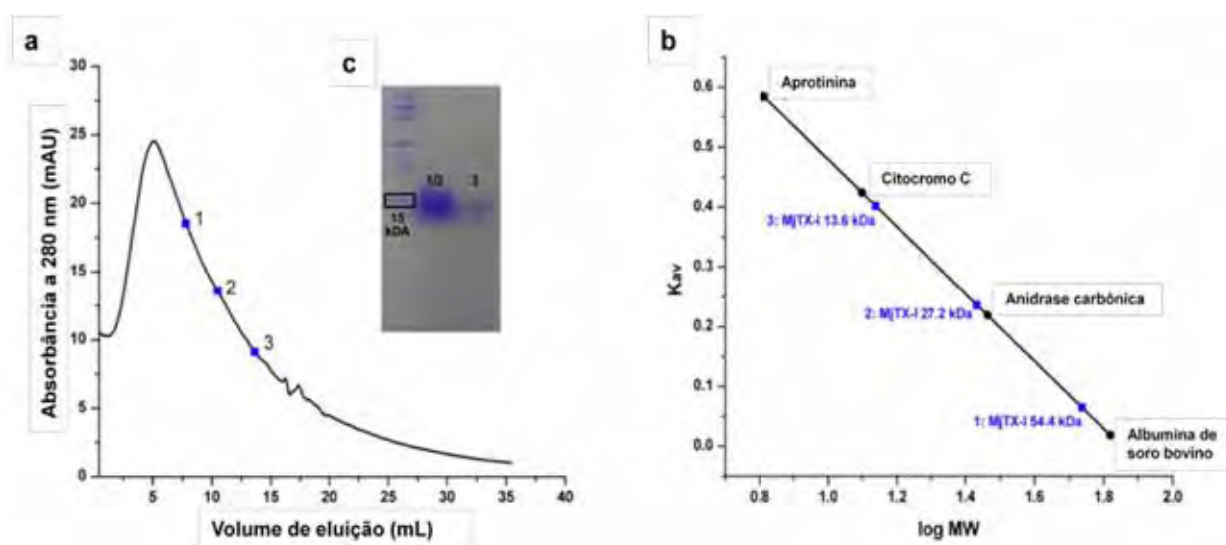


Figura 35: (a) Cromatografia de exclusão de tamanho da MjTX-I em 20mM de Tris HCl pH8,0. A curva mostra a MjTX-I em diferentes posições no pico obtido. (b) Curva de calibração determinada usando proteínas padrão mostram diferentes conformações oligoméricas da MjTX-I em 20mM de Tris HCl pH8,0. As proteínas padrão foram obtidas do kit de calibração de proteínas de baixo peso (Sigma-Aldrich) contendo: Albumina de soro bovino (66kDa), Anidrase carbônica (29kDa), Citocromo C (12,4kDa) e Aprotinina (6,5kDa). (c) Para verificar a pureza das amostras, foi feito gel 13% SDS-PAGE.

4.3.4 – Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)

Os experimentos de SAXS foram feitos pelos Profs. Dr. Cristiano L. P. Oliveira, no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – São

Paulo e Roberto M. Fernandez da UNESP de Botucatu. As medidas foram realizadas utilizando o equipamento NANOSTAR (Bruker) em temperatura ambiente. A amostra de MjTX-I com concentração de 5mg/mL foi exposta a experimentos de espalhamento utilizando capilares de quartzo presos em um aparato de aço inoxidável. As medidas de *background* do tampão foram coletadas também em capilares do mesmo tipo. Os dados foram obtidos por exposição de 3600s ao feixe de raios X e tratados utilizando o pacote SUPERSAXS (OLIVEIRA; PEDERSEN, comunicação pessoal). Após o tratamento, os dados foram normalizados para escala absoluta usando água como padrão primário (Figura 36).

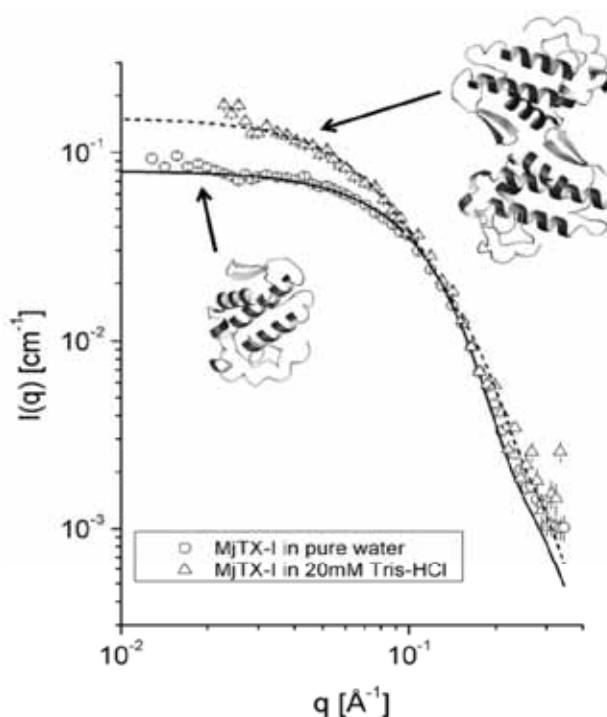


Figura 36: Dados experimentais de SAXS que corresponde à ajustes da MjTX-I+água (círculos) e MjTX-I + Tris HCl (triângulos).

Como observado na Figura 36, os dados obtidos com amostra de MjTX-I em água ultra-pura como solvente mostraram que a curva experimental se ajusta melhor à curva teórica para a molécula monomérica, diferentemente da curva experimental da amostra de MjTX-I usando Tris HCl como solvente, que melhor corresponde à curva teórica obtida para a molécula dimérica.

A fim de se obter a curva da função $[p(r)]$, foi feita a Transformação Indireta de Fourier, utilizando o método de Glatter (GLATTER, 1977) (Figura 37).

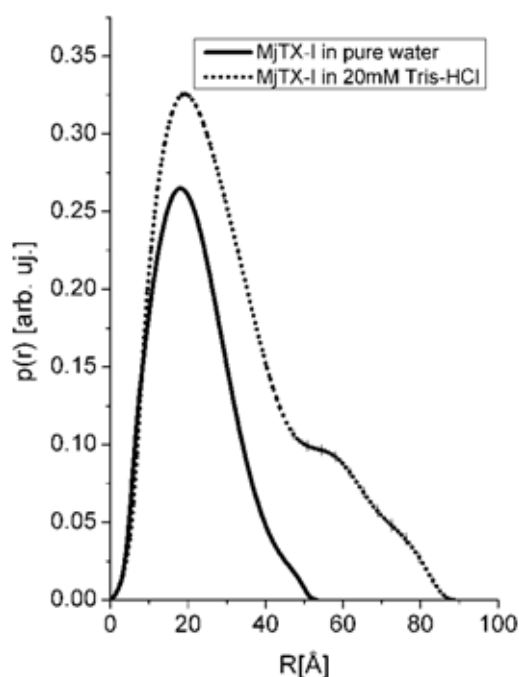


Figura 37: Função de distribuição $[p(r)]$ da MjTX-I+água (linha contínua) e MjTX-I + Tris HCl (linha pontilhada). Calculados usando programa GNOM (SEMENYUK; SVERGUN, 1991).

Os valores médios da função de distribuição $[p(r)]$ para a amostra de MjTX-I + água ultra-pura e para a amostra de MjTX-I + Tris HCl estão dispostos na Tabela 09, assim como valores calculados de raio de giro e massa molecular estimados pelos experimentos de SAXS.

Tabela 09: Valores médios da função de distribuição $[p(r)]$.

	MjTX-I + Água	MjTX-I + Tris HCl
R_g (Å)	16.7 ± 0.5	26.2 ± 0.3
D_{max} (Å)	~ 53	~ 89
MW (kDa)	18 ± 3	43 ± 6

A função de distribuição $[p(r)]$ da MjTX-I + água mostrou um raio de giro médio de $16,7\text{Å}$, com a distância máxima entre os átomos de aproximadamente 53Å e a massa molecular de cerca de 18kDa . Estes valores correspondem a uma molécula de MjTX-I, logo, o valor do raio de giro médio de $26,2\text{Å}$, distância média de aproximadamente 89Å e massa molecular aproximada a 43kDa , correspondem a duas moléculas de MjTX-I.

Além disso, os estudos de SAXS também mostraram que o envelope eletrônico da MjTX-I em solução contendo Tris HCl, se assemelha à estrutura do dímero convencional, onde os valores obtidos experimentalmente se ajustam melhor à curva calculada para esta conformação (Figura 38).

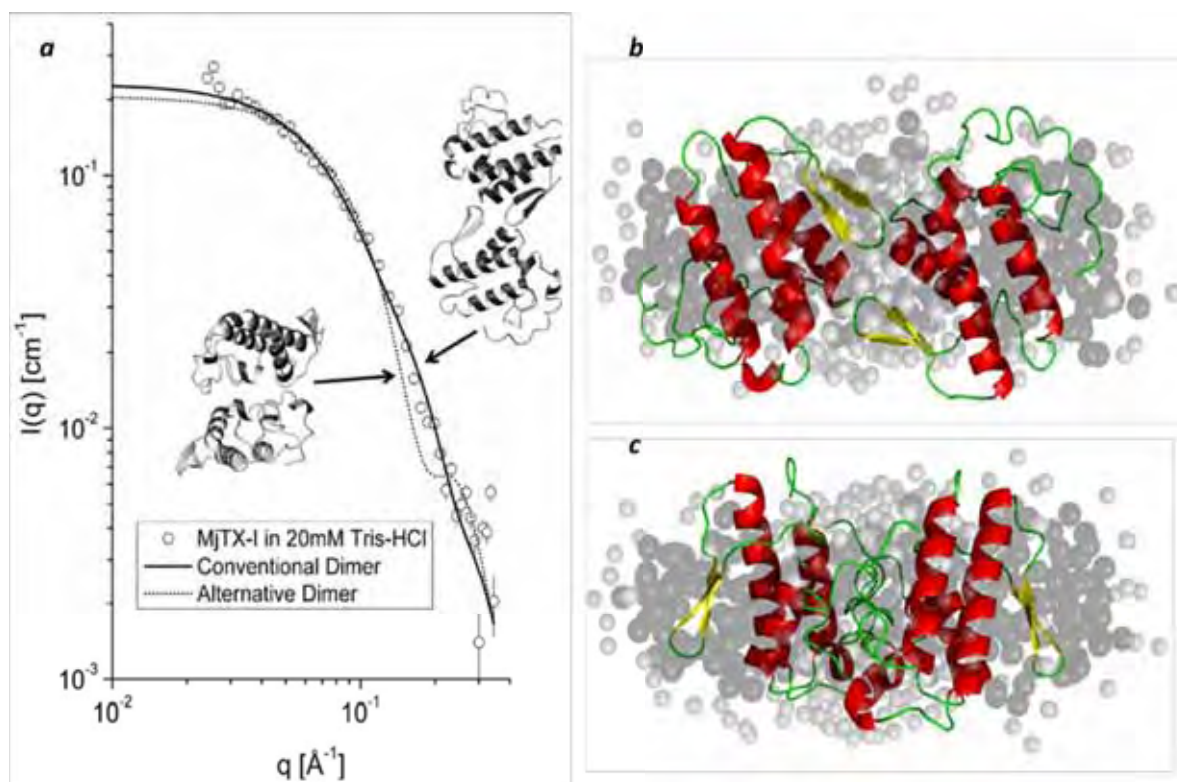


Figura 38: (a) Curvas de espalhamento dos dímeros convencional e alternativo, onde o melhor ajuste dos resultados experimentais é da conformação convencional para a MjTX-I. (b) Envelope eletrônico da MjTX-I na conformação convencional. (c) Envelope eletrônico da MjTX-I na conformação alternativa.

A estrutura cristalográfica da MjTX-I possui quatro moléculas na unidade assimétrica, diferentemente do que encontrado nos estudos em solução utilizando as técnicas de DLS, cromatografia de exclusão molecular e SAXS. Mesmo quando a estrutura é analisada pelo programa *online* PDBe PISA, não ocorre a formação de um complexo estrutural oligomérico em solução. Sugerimos então, que a toxina se encontra na forma monomérica ou dimerica em meio biológico, já que a mesma é muito instável em solução.

CONCLUSÕES

5 – CONCLUSÕES

Os resultados mostrados nesta dissertação revelam diferenças nas estruturas das Fosfolipases A₂ e Fosfolipases A₂ homólogas que despertam bastante interesse quanto ao real mecanismo de ação destas proteínas. No caso da BmooPLA₂-I, que é uma Asp49-PLA₂, a comparação entre sua estrutura e outras PLA₂s ácidas dotadas ou não da capacidade de inibir a agregação plaquetária revelou que possivelmente uma pequena sequência encontrada no C-terminal da proteína tem grande importância nesta ação. Contudo, outra PLA₂ com a mesma sequência não possui esta ação, o que sugere que outros fatores estruturais também são importantes, o que pode ser mais bem estudado pela técnica de cristalografia por raios X.

A toxina MjTX-II é uma Lys49-PLA₂ cristalizada na presença de moléculas de PEG4000, e quando as condições de cristalização de outras Lys49-PLA₂s são comparadas, é notado que a maioria delas foram cristalizadas com moléculas do mesmo tipo, as quais podem contribuir diretamente na cristalização destas proteínas. Também foi reforçado que a região do sítio ativo destas moléculas possui afinidade com moléculas de cadeia longa e que a molécula teórica de ácido esteárico ligado a estrutura da PrTX-II é na verdade uma molécula de PEG3350, pois as moléculas que possuem menor distância entre as moléculas hidrofóbicas em relação a His48, possuem os resíduos Cys29 e Gly30 hiperpolarizados pela Lys122, fazendo assim que o C-terminal fique exposto, oferecendo mais contatos eletrostáticos entre as proteínas e as membranas, possibilitando assim que o sítio miotóxico destas proteínas possa agir na membrana celular. Esta hiperpolarização somente ocorre devido a ligação entre o N^o1 da His48 e o oxigênio da ponta da molécula de cadeia longa, confirmando a teoria anteriormente apresentada em que a atividade catalítica das Lys49-PLA₂s não é somente abolida pela presença da cadeia lateral da Lys122 no *loop* de ligação de cálcio, mas sim por outros fatores estruturais.

A estrutura cristalográfica da MjTX-I é diferenciada de outras Lys49-PLA₂s, pois na unidade assimétrica é observado a presença de quatro moléculas. Técnicas de estudo em solução tais como DLS e SAXS mostraram que esta toxina apresenta um comportamento peculiar, pois quando é adicionado solução tamponada de Tris HCl, o que altera a força iônica da solução, esta toxina possui a tendência a formar outros estados oligoméricos. Os experimentos de cromatografia de exclusão molecular também mostraram que a toxina possui a tendência de oligomerizar, com base na curva de calibração que compara proteínas de massa molecular já conhecidas.

Além disso, os estudos de SAXS mostraram que a estrutura do dímero convencional melhor se ajusta ao envelope eletrônico da MjTX-I, contrariando outros estudos que apontam a conformação alternativa como aquela encontrada em solução. Porém, o dímero alternativo ainda pode ser considerado, já que a MjTX-I possui um caráter instável, sendo capaz de formar oligômeros quando liofilizadas e estocadas por três semanas a 4°C (Soares *et al.*, 2000).

Talvez esta conformação oligomérica diferenciada da MjTX-I possa não ser só um artefato de cristalização, mas sim estar associada a novas funções da toxina, pois evolutivamente a serpente *B. moojeni* passou a habitar regiões de clima árido (como o cerrado), mudando assim parte da sua dieta, diferentemente de outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*.

5.1 – Perspectivas

Ainda são necessários melhores estudos em relação à função das proteínas apresentadas neste trabalho. Estudos mais detalhados com regiões propostas por outros autores em comparação com os resultados obtidos devem ser feitos com a BmooPLA₂-I serão executados no início do trabalho de doutorado.

Trabalhos de mutação sítio dirigida planejados para o futuro com a MjTX-I, alguns, por exemplo, também podem ajudar na elucidação da funcionalidade desta toxina. O artigo científico referente às análises da estrutura da MjTX-I já está em fase final de redação, onde serão discutidos os resultados apresentados aqui nesta dissertação e talvez novas análises que serão feitas futuramente.

PUBLICAÇÕES

6 – PUBLICAÇÕES

Os resultados referentes a cristalização da BmooPLA₂-I foram publicados no ano de 2011 na revista *Acta Crystallographica Section F*, o qual foi intitulado: “Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmooPLA₂-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* venom” (v.67, p.900-902) (Anexo I).

Além dos resultados apresentados nesta dissertação, foram publicados dados em colaboração no artigo “Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s” que foi publicado na revista *Journal of Structural Biology* (v.171, p.31-43) (Anexo II), os quais alguns resultados deste artigo foram usados na discussão com a estrutura da MjTX-II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSIO, A. L.; NONATO, M. C.; DE ARAUJO, H. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J Biol Chem**, v.280, n.8, p.7326-35. 2005.
- ANDRIO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; CORREA, F. M.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v.64, n.4, p.723-32. 2002.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: (Ed.). Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.
- ARNI, R. K.; FONTES, M. R.; BARBERATO, C.; GUTIERREZ, J. M.; DIAZ, C.; WARD, R. J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Arch Biochem Biophys**, v.366, n.2, p.177-82. 1999.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. **Toxicon**, v.34, n.8, p.827-41. 1996.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg Med (Fremantle)**, v.13, n.1, p.28-36. 2001.
- BANUMATHI, S.; RAJASHANKAR, K. R.; NOTZEL, C.; ALEKSIEV, B.; SINGH, T. P.; GENOV, N.; BETZEL, C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.57, n.Pt 11, p.1552-9. 2001.
- BOGAN, A. A.; THORN, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. **J Mol Biol**, v.280, n.1, p.1-9. 1998.
- BORGSTAHL, G. E. O. How to Use Dynamic Light Scattering to Improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals. In: DOUBLIÉ, S. (Ed.). Macromolecular Crystallography Protocols. Totowa: Humana Press Inc., v.1, 2007, p.109-129.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York and London: Garland Publishing. 1991. 302 p.
- BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotopotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. **European Journal of Biochemistry**, v.49, n.2, p.333-45. 1974.
- BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J. S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.54, n.Pt 5, p.905-21. 1998.
- CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v.42, n.11, p.1405-14. 2007.
- CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao Ofidismo. In: (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. Introdução ao Ofidismo

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

CHANG, C. C.; LEE, C. Y. Isolation of Neurotoxins from the Venom of *Bungarus Multicinctus* and Their Modes of Neuromuscular Blocking Action. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.144, p.241-57. 1963.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B., 3RD; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.66, n.Pt 1, p.12-21. 2010.

CLACKSON, T.; WELLS, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. **Science**, v.267, n.5196, p.383-6. 1995.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v.88, n.12, p.1947-59. 2006.

CORREA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. 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, p.591-9. 2008.

DA SILVA GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C.; DE AZEVEDO, W. F., JR.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v.30, n.4, p.442-54. 1998.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENCA, R. C.; OLIVA, M. L.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA₂, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v.72, n.3, p.377-84. 2006.

DE AZEVEDO, W. F., JR.; WARD, R. J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J. R.; ARNI, R. K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v.36, n.10, p.1395-406. 1998.

DELANO, W. S. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos: Delano Scientific. 2002

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J Biol Chem**, v.269, n.18, p.13057-60. 1994.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v.66, n.17, p.2851-71. 2009.

DOS SANTOS, J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A.; PIZZO, P.; CINTRA, A. C.; BRAZ, A. S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins**, v.79, n.1, p.61-78. 2011.

DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. The intriguing phospholipases A₂ homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein Pept Lett**, v.16, n.8, p.887-93. 2009.

- DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**. New York: Springer-Verlag. 1994. 311 p.
- DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A practical approach**. New York: Oxford University Press. 1992. 331 p.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.60, n.Pt 12 Pt 1, p.2126-32. 2004.
- FERNANDES, C. A.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **Journal of Structural Biology**. 2010.
- FERNANDEZ, J.; GUTIERREZ, J. M.; ANGULO, Y.; SANZ, L.; JUAREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, v.92, n.3, p.273-83. 2010.
- FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das Serpentes (Squamata) I. Scolecophidia e Alethynophidia não colubrídeos. In: (Ed.). Herpetologia no Brasil. Belo Horizonte: Fund. Biodiversitas & Fund. Ezequiel Dias, 1994, p.69-80.
- FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, II. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch Biochem Biophys**, v.284, n.2, p.352-9. 1991.
- FULY, A. L.; DE MIRANDA, A. L.; ZINGALI, R. B.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v.63, n.9, p.1589-97. 2002.
- GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. Oxford: Oxford Science Publishers. 1992. 654 p.
- GLATTER, O. Data Evaluation in Small-Angle Scattering - Calculation of Radial Electron-Density Distribution by Means of Indirect Fourier Transformation. **Acta Physica Austriaca**, v.47, n.1-2, p.83-102. 1977.
- GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Structural symmetry and protein function. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v.29, p.105-53. 2000.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1405-24. 1995.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr Pharm Des**, v.13, n.28, p.2935-50. 2007.
- HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex-an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v.16, n.1, p.19-30. 1978.
- HOGUE, A. R. Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpentes - Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v.32, p.109-184. 1965.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, n.7, p.615-27. 1988.

HU, Z.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. **Proteins**, v.39, n.4, p.331-42. 2000.

JANCARIK, J.; SCOTT, W. G.; MILLIGAN, D. L.; KOSHLAND, D. E., JR.; KIM, S. H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. **J Mol Biol**, v.221, n.1, p.31-4. 1991.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v.299, n.1-2, p.279-91. 2002.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **Plos Medicine**, v.5, n.11, p.1591-1604. 2008.

KINI, R. M. **Phospholipase A₂ enzyme: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley. 1997

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, n.8, p.827-40. 2003.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of phospholipases A₂ enzymes on platelet aggregation. In: (Ed.). Venom phospholipases A₂ enzymes: structure, function and mechanism. England: John Wiley and Sons Ltd, 1997, p.369-387.

KLEYWEGT, G. J. Validation of protein crystal structures. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.56, n.Pt 3, p.249-65. 2000.

KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; TEH, T.; HEIERHORST, J. K., B.E. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE, D. G. (Ed.). Protein phosphorylation: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1999, p.127-151.

KUBINYI, H. Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v.1, n.1, p.4-15. 1998.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, n.21, p.2947-8. 2007.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291. 1993.

LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂ - a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, n.1, p.28-36. 2001.

- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers. 1993. 725 p.
- LESLIE, A. G. W. Jt CCP4/ESF-EACBM Newsl. **Protein Crystallography**, v.26. 1992.
- LIU, S. Y.; YOSHIKUMI, K.; ODA, N.; OHNO, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. 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, p.400-8. 1990.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B., 3RD; DE BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by C-alpha geometry: phi,psi and C-beta deviation. **Proteins**, v.50, n.3, p.437-50. 2003.
- LU, Q. M.; JIN, Y.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A₂. **J Nat Toxins**, v.11, n.1, p.25-33. 2002.
- MAGRO, A. J.; TAKEDA, A. A.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.61, n.Pt 12, p.1670-7. 2005.
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A.; LACHAT, J. J.; DE ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n.5, p.615-26. 1995.
- MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with *p*-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.11, p.1583-90. 2009.
- MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v.61, n.Pt 10, p.882-4. 2005.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, n.12, p.1749-800. 1998.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1477, n.1-2, p.146-56. 2000.
- MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. Malabar: Krieger Publishing Company. 1989
- MCREE, D. E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press. 1993. 386 p.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: (Ed.). Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003, p.33-61.
- MOREIRA, L. A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; ABRAHAM, E. G.; CRISANTI, A.; NOLAN, T.; CATTERUCCIA, F.; JACOBS-LORENA, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J Biol Chem**, v.277, n.43, p.40839-43. 2002.
- MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochem Pharmacol**, v.48, n.1, p.1-10. 1994.

- MURAKAMI, M. T.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. B.; CALIL-ELIAS, S.; TOMAZ, M. A.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J Mol Biol**, v.350, n.3, p.416-26. 2005.
- MURAKAMI, M. T.; GABDOULKHAKOV, A.; GENOV, N.; CINTRA, A. C.; BETZEL, C.; ARNI, R. K. Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. **Biochimie**, v.88, n.5, p.543-9. 2006.
- MURAKAMI, M. T.; VICOTI, M. M.; ABREGO, J. R.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v.49, n.3, p.378-87. 2007.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.53, n.Pt 3, p.240-55. 1997.
- NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. J.; VIDAL, J. C. Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon**, v.24, n.8, p.807-17. 1986.
- NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. J.; VIDAL, J. C. Effect of chemical modification with *p*-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz) venom. **Toxicon**, v.26, n.12, p.1137-44. 1988.
- NOOREN, I. M.; THORNTON, J. M. Diversity of protein-protein interactions. **EMBO J**, v.22, n.14, p.3486-92. 2003.
- OLIVERO, A.; TEIXEIRA, C. F.; WALLACE, J. L.; GUTIERREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v.49, n.5, p.670-7. 2007.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v.276, p.307-326. 1997.
- OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, n.3, p.411-45. 1999.
- PANFOLI, I.; CALZIA, D.; RAVERA, S.; MORELLI, A. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: old and new approaches. **Toxins (Basel)**, v.2, n.4, p.417-27. 2010.
- PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. [Snake bites]. **Rev Assoc Med Bras**, v.47, n.1, p.24-9. 2001.
- PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. **Protein J**, v.25, n.2, p.147-55. 2006.
- POTTERTON, L.; MCNICHOLAS, S.; KRISSINEL, E.; GRUBER, J.; COWTAN, K.; EMSLEY, P.; MURSHUDOV, G. N.; COHEN, S.; PERRAKIS, A.; NOBLE, M. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.60, n.Pt 12 Pt 1, p.2288-94. 2004.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; NOMIZO, A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M.; FRANCA, S. C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J**, v.23, n.4, p.273-85. 2004.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FACA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANCA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr Purif**, v.37, n.1, p.102-8. 2004.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.50, n.1, p.153-65. 2007.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.52, n.8, p.908-17. 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, n.11, p.1246-59. 2006.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, n.4987, p.1541-6. 1990.

SEMENYUK, A. V.; SVERGUN, D. I. Gnom - a Program Package for Small-Angle Scattering Data-Processing. **Journal of Applied Crystallography**, v.24, p.537-540. 1991.

SERRANO, S. M.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch Biochem Biophys**, v.367, n.1, p.26-32. 1999.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.1-2, p.1-19. 2000.

SOARES, A. M.; ANDRAIO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v.373, n.1, p.7-15. 2000.

SOARES, A. M.; GUERRA-SA, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v.378, n.2, p.201-9. 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v.36, n.3, p.503-14. 1998.

SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STABELI, R. G.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.2, p.258-70. 2004.

SOUZA, D. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GARRATT, R. C. Determination of the three-dimensional structure of toxins by protein crystallography. **Toxicon**, v.38, n.10, p.1307-53. 2000.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA, F. P., JR.; IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; DOS SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch Toxicol**, v.85, n.10, p.1219-33. 2011.

UHL, W.; SCHRAG, H. J.; SCHMITTER, N.; NEVALAINEN, T. J.; AUFENANGER, J.; WHEATLEY, A. M.; BUCHLER, M. W. Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A₂ in acute pancreatitis: an experimental study in rats. **Gut**, v.40, n.3, p.386-92. 1997.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v.30, p.1022-1025. 1997.

WAITE, M. **Handbook of Lipid Research**. New York: Plenum Press. 1997

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v.362, n.Pt 1, p.89-96. 2002.

WARD, R. J.; DE AZEVEDO, W. F., JR.; ARNI, R. K. At the interface: crystal structures of phospholipases A₂. **Toxicon**, v.36, n.11, p.1623-33. 1998.

WATANABE, L.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; ARNI, R. K. Initiating structural studies of Lys49-PLA₂ homologues complexed with an anionic detergent, a fatty acid and a natural lipid. **Protein Pept Lett**, v.10, n.5, p.525-30. 2003.

WATANABE, L.; SOARES, A. M.; WARD, R. J.; FONTES, M. R.; ARNI, R. K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v.87, n.2, p.161-7. 2005.

WILLIAMS, D.; GUTIERREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v.375, n.9708, p.89-91. 2010.

ANEXO – I

“Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmooPLA₂-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* venom”

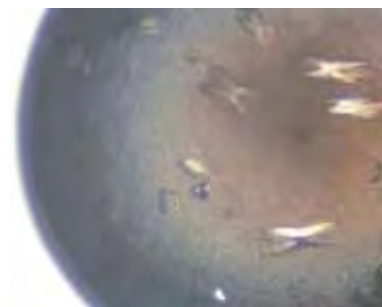
Guilherme H. M. Salvador,^{a,b}
Daniela P. Marchi-Salvador,^{a,c,†}
Lucas B. Silveira,^c Andreimar M.
Soares^d and Marcos R. M.
Fontes^{a,b,*}

^aDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil, ^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas, CNPq, Brazil, ^cDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil, and ^dFundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas - CEBio, Núcleo de Saúde, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho-RO, Brazil

† Present address: Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, UFPB, João Pessoa-PB, Brazil.

Correspondence e-mail: fontes@ibb.unesp.br

Received 14 February 2011
Accepted 18 June 2011



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmooPLA₂-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* venom

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are enzymes that cause the liberation of fatty acids and lysophospholipids by the hydrolysis of membrane phospholipids. In addition to their catalytic action, a wide variety of pharmacological activities have been described for snake-venom PLA₂s. BmooPLA₂-I is an acidic, nontoxic and catalytic PLA₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom which exhibits an inhibitory effect on platelet aggregation, an immediate decrease in blood pressure, inducing oedema at a low concentration, and an effective bactericidal effect. BmooPLA₂-I has been crystallized and X-ray diffraction data have been collected to 1.6 Å resolution using a synchrotron-radiation source. The crystals belonged to space group C222₁, with unit-cell parameters $a = 39.7$, $b = 53.2$, $c = 89.2$ Å. The molecular-replacement solution of BmooPLA₂-I indicated a monomeric conformation, which is in agreement with nondenaturing electrophoresis and dynamic light-scattering experiments. A comparative study of this enzyme with the acidic PLA₂ from *B. jararacussu* (BthA-I) and other toxic and nontoxic PLA₂s may provide important insights into the functional aspects of this class of proteins.

1. Introduction

Snake venoms comprise a complex mixture of pharmacological components that are able to affect several biological systems. Phospholipases A₂ (PLA₂s) are one of the main components of snake venoms and are small (~14 kDa), stable, calcium-dependent and disulfide-rich molecules that are found in a great diversity of organisms and biological fluids (Schaloske & Dennis, 2006). This enzyme promotes the hydrolysis of the *sn*-2 acyl groups of membrane phospholipids (*sn*-3 glycerophospholipids), releasing free fatty acids and lysophospholipids such as arachidonic acid (Schaloske & Dennis, 2006; Van Deenen & De Haas, 1963).

PLA₂s have been classified into 15 different groups which can be divided into five types of enzyme: secreted PLA₂s, cytosolic PLA₂s, Ca²⁺-independent PLA₂s, PAF acetylhydrolases and lysosomal PLA₂s (Schaloske & Dennis, 2006). The snake-venom PLA₂s from the Elapidae and Viperidae (pit viper) families, which are the most important when considering envenomation and its effects, belong to the IA and IIA/IIB groups, respectively. In addition to their catalytic action, a wide variety of pharmacological activities have been described for snake-venom PLA₂s, such as pre-synaptic (Chang *et al.*, 1977; Westerlund *et al.*, 1993) or post-synaptic (Bon *et al.*, 1979) neurotoxicity, myotoxicity (Gutiérrez *et al.*, 1991), cardiotoxicity (Fletcher *et al.*, 1981) and bactericidal (Páramo *et al.*, 1998), platelet-aggregation inhibition (Yuan *et al.*, 1993), oedema-forming (Lloret & Moreno, 1993), haemolytic (Condrea *et al.*, 1981), anti-coagulative (Rosenberg *et al.*, 1983), convulsive (Fletcher *et al.*, 1980) and hypotensive (Huang, 1984) effects. Some of these activities are correlated with the enzymatic activity, while others are completely independent (Kini & Evans, 1989; Soares & Giglio, 2004). Despite the number of data that are available, the mechanisms involved in these biological and pharmacological activities remain poorly known. Envenomation resulting from snake bites is an important public health problem in rural areas of tropical and subtropical countries in

Asia, Africa, Oceania and Latin America and is considered as a neglected tropical disease by the World Health Organization (WHO). Recent statistics from the WHO estimate that at least 421 000 envenomations and 20 000 deaths occur worldwide from snakebites each year, but warn that these figures may be as high as 1 841 000 envenomations and 94 000 deaths (World Health Organization, 2010). Despite the majority of deaths from snakebites occurring in South and South East Asia and sub-Saharan Africa (Kasturiratne *et al.*, 2008), these accidents are also an important health problem in Latin America as they may cause permanent tissue loss and amputation of the affected limb (Gutiérrez & Lomonte, 1995). Snakebites from snakes of the *Bothrops* genus are responsible for more than 85% of all ophidian accidents reported in Latin America (Fundação Nacional de Saúde, 2001; de Oliveira, 2009) and display drastic local tissue damage among other biological effects (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

Many noncatalytic homologues of PLA₂s (Lys49-PLA₂s) have been purified from *Bothrops* snake venoms and structurally and functionally characterized (Watanabe *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2004; Magro *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Arni *et al.*, 1999; da Silva-Giotto *et al.*, 1998; de Azevedo *et al.*, 1999). Despite the isolation of several catalytic bothropic PLA₂s (Selistre *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1990; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Mancuso *et al.*, 1995; Santos-Filho *et al.*, 2008), little is known about the mechanism of action of these PLA₂s, probably owing to their low concentration in the venom, which leads to experimental difficulties in structural and functional studies. In contrast, the acidic PLA₂s have high catalytic activity and other relevant pharmacological effects and are important models for structure–function relationship studies between toxic and nontoxic snake-venom PLA₂s. The unique bothropic structure available for this class of PLA₂ is that of BthA-I (an acidic PLA₂ from *B. jararacussu* venom), which has been described in two conformational states: monomeric and dimeric (Magro *et al.*, 2004). The structure of BthA-I complexed with the inhibitor *p*-bromophenacyl bromide has also been solved (Magro *et al.*, 2005).

BmooPLA₂-I is an acidic, nontoxic and catalytic phospholipase A₂ isolated from *B. moojeni* snake venom which exhibits an inhibitory effect on platelet aggregation, causes an immediate decrease in blood pressure, inducing oedema at a low concentration, and has an effective bactericidal effect (data not shown).

In order to better understand the structure–function relationship of these bothropic proteins, we describe the crystallization, X-ray diffraction data collection and molecular-replacement solution of BmooPLA₂-I.

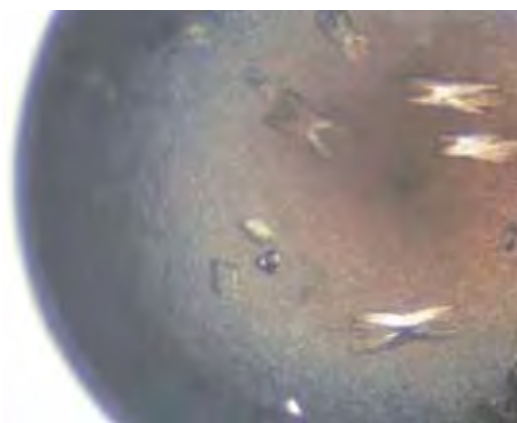


Figure 1
Crystals of BmooPLA₂-I from *B. moojeni*.

Table 1

X-ray diffraction data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell. Data were processed using the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997).

Unit-cell parameters (Å)	$a = 39.7, b = 53.2, c = 89.2$
Space group	C222 ₁
Resolution (Å)	50–1.60 (1.66–1.60)
Unique reflections	12806 (1249)
Completeness (%)	99.2 (97.8)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	3.3 (16.5)
Radiation source	Synchrotron (MX1 station, LNLS)
Data-collection temperature (K)	100
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	45.3 (7.7)
Multiplicity	5.7 (5.3)
Matthews coefficient V_M (Å ³ Da ^{−1})	1.75
Molecules in asymmetric unit	1
Solvent content (%)	29.7

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an individual measurement of the reflection with Miller indices hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of that reflection. It was calculated for reflections with $I > -3\sigma(I)$.

2. Materials and methods

2.1. Protein purification and crystallization

BmooPLA₂-I was isolated from *B. moojeni* snake venom by ion-exchange chromatography on a CM-Sepharose Fast Flow column (2.0 × 20 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer pH 7.8. The homogeneity of the toxin was assayed by SDS–PAGE (data not shown).

A lyophilized sample of BmooPLA₂-I was dissolved in ultrapure water to a concentration of 14 mg ml^{−1}. The sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) was used to perform initial screening for crystallization conditions (Crystal Screen, Hampton Research). Improved crystals of BmooPLA₂-I were obtained using the conventional hanging-drop vapour-diffusion method (McPherson, 1982), in which 1 μl protein solution and 1 μl reservoir solution were mixed and equilibrated against a reservoir (500 μl) consisting of 32% (w/v) polyethylene glycol 1500. The crystals measured approximately 0.1 × 0.12 × 0.06 mm after 20 d at 291 K (Fig. 1).

2.2. Dynamic light scattering

Dynamic light-scattering measurements were performed with lyophilized BmooPLA₂-I at 283 K at a concentration of 0.5 mg ml^{−1} using a DynaPro Titan instrument (Wyatt Technology). The protein solution was prepared in ultrapure water. Data were measured 100 times and the results were analyzed using the *DYNAMICS* v.6.10 software.

2.3. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data were collected from a single BmooPLA₂-I crystal at a wavelength of 1.430 Å (at 100 K) using a synchrotron-radiation source [MX1 station, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), Campinas, Brazil] and a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). The crystal was mounted in a nylon loop and flash-cooled in a stream of nitrogen at 100 K without a cryoprotectant. The crystal-to-detector distance was 60 mm and an oscillation range of 1° was used, resulting in the collection of a total of 150 images. The data were processed to 1.6 Å resolution using the *HKL* program package (Otwinowski & Minor, 1997).

3. Results and discussion

The data-collection statistics are shown in Table 1. The data set was 99.2% complete at 1.6 Å resolution, with an R_{merge} of 3.3%. The

crystals belonged to the centred orthorhombic space group $C222_1$, with unit-cell parameters $a = 39.7$, $b = 53.2$, $c = 89.2$ Å. Calculations based on the protein molecular weight indicated the presence of one molecule in the asymmetric unit. This corresponds to a Matthews coefficient V_M (Matthews, 1968) of $1.75 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$, with a calculated solvent content of 29.7%. These values are within the expected range for typical protein crystals, assuming a value of $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ for the protein partial specific volume.

Dynamic light-scattering (DLS) experiments performed on BmooPLA₂-I indicated a mean hydrodynamic radius (R_h) of 1.8 nm and a polydispersity of 11.9%. This R_h value corresponds to a molecular weight of approximately 14 kDa and is thus equivalent to a monomer.

The crystal structure of BmooPLA₂-I was determined using molecular-replacement techniques implemented using the program *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010) with the coordinates of an acidic PLA₂ from *B. jararacussu* (PDB code 1zlb; Murakami *et al.*, 2006) as the search model. The structure presents a monomeric configuration.

In conclusion, BmooPLA₂-I isolated from *B. moojeni* venom was crystallized and X-ray diffraction data were collected to 1.6 Å resolution. The structure presented a monomeric arrangement. Further structural studies, including a structural comparison with other PLA₂s, including myotoxin I, may provide insights into the molecular basis of its pharmacological actions, including its inhibition of platelet aggregation and its hypotensive effects.

The authors gratefully acknowledge financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

References

- Arni, R. K., Fontes, M. R., Barberato, C., Gutiérrez, J. M., Díaz, C. & Ward, R. J. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 177–182.
- Azevedo, W. F. de, Ward, R. J., Gutiérrez, J. M. & Arni, R. K. (1999). *Toxicon*, **37**, 371–384.
- Bon, C., Changeux, J.-P., Jeng, T.-W. & Fraenkel-Conrat, H. (1979). *Eur. J. Biochem.* **99**, 471–481.
- Chang, C. C., Lee, J. D., Eaker, D. & Fohlman, J. (1977). *Toxicon*, **15**, 571–576.
- Condrea, E., Yang, C.-C. & Rosenberg, P. (1981). *Thromb. Haemost.* **45**, 82–85.
- Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C.-C. & Rosenberg, P. (1981). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 375–388.
- Fletcher, J. E., Rapuano, B. E., Condrea, E., Yang, C.-C., Ryan, M. & Rosenberg, P. (1980). *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1565–1574.
- Fundação Nacional de Saúde (2001). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: MS/FUNASA.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1995). *Toxicon*, **33**, 1405–1424.
- Gutiérrez, J. M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A. C., Homs-Brandeburgo, M. I. & Giglio, J. R. (1991). *Exp. Mol. Pathol.* **55**, 217–229.
- Huang, H.-C. (1984). *Toxicon*, **22**, 359–372.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., de Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. G. & de Silva, H. J. (2008). *PLoS Med.* **5**, e218.
- Kini, R. M. & Evans, H. J. (1989). *Biochemistry*, **28**, 9209–9215.
- Lee, W.-H., da Silva Giotto, M. T., Marangoni, S., Toyama, M. H., Polikarpov, I. & Garratt, R. C. (2001). *Biochemistry*, **40**, 28–36.
- Lloret, S. & Moreno, J. J. (1993). *Toxicon*, **31**, 949–956.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Furtado, M. F., Otero, R., Rosso, J. P., Vargas, O., Carmona, E. & Rovira, M. E. (1990). *Toxicon*, **28**, 1137–1146.
- Magro, A. J., Murakami, M. T., Marcussi, S., Soares, A. M., Arni, R. K. & Fontes, M. R. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 24–31.
- Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. & Fontes, M. R. (2003). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 713–720.
- Magro, A. J., Takeda, A. A. S., Soares, A. M. & Fontes, M. R. M. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 1670–1677.
- Mancuso, L. C., Correa, M. M., Vieira, C. A., Cunha, O. A., Lachat, J. J., de Araujo, H. S., Ownby, C. L. & Giglio, J. R. (1995). *Toxicon*, **33**, 615–626.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley.
- Murakami, M. T., Gabdoulkhakov, A., Genov, N., Cintra, A. C., Betzel, C. & Arni, R. K. (2006). *Biochimie*, **88**, 543–549.
- Oliveira, R. C. W. de (2009). *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Envenenamentos*. São Paulo: Sarvier.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Páramo, L., Lomonte, B., Pizarro-Cerdá, J., Bengoechea, J. A., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (1998). *Eur. J. Biochem.* **253**, 452–461.
- Rosenberg, P., Condrea, E., Rapuano, B. E., Soons, K. R. & Yang, C.-C. (1983). *Biochem. Pharmacol.* **32**, 3525–3530.
- Santos-Filho, N. A., Silveira, L. B., Oliveira, C. Z., Bernardes, C. P., Menaldo, D. L., Fuly, A. L., Arantes, E. C., Sampaio, S. V., Mamede, C. C., Beletti, M. E., de Oliveira, F. & Soares, A. M. (2008). *Toxicon*, **52**, 908–917.
- Schaloske, R. H. & Dennis, E. A. (2006). *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1246–1259.
- Selistre, H. S., Queiroz, L. S., Cunha, O. A., De Souza, G. E. & Giglio, J. R. (1990). *Toxicon*, **28**, 261–273.
- da Silva Giotto, M. T., Garratt, R. C., Oliva, G., Mascarenhas, Y. P., Giglio, J. R., Cintra, A. C., de Azevedo, W. F., Arni, R. K. & Ward, R. J. (1998). *Proteins*, **30**, 442–454.
- Soares, A. M. & Giglio, J. R. (2004). *Toxicon*, **42**, 855–868.
- Soares, A. M., Sestito, W. P., Marcussi, S., Stábeli, R. G., Andrião-Escarso, S. H., Cunha, O. A., Vieira, C. A. & Giglio, J. R. (2004). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 258–270.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.
- Van Deenen, L. L. M. & De Haas, G. H. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 538–553.
- Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R. & Arni, R. K. (2005). *Biochimie*, **87**, 161–167.
- Westerlund, B., Nordlund, P., Uhlin, U., Eaker, D. & Eklund, H. (1993). *FEBS Lett.* **301**, 159–166.
- World Health Organization (2010). *Neglected Tropical Diseases: Snakebite*. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html.
- Yuan, Y., Jackson, S. P., Mitchell, C. A. & Salem, H. H. (1993). *Thromb. Res.* **70**, 471–481.

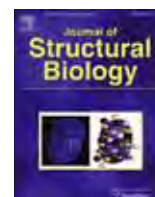
ANEXO – II

“Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca^{2+} -binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s”



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi

Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s

Carlos A.H. Fernandes^{a,b,1}, Daniela P. Marchi-Salvador^{a,c,1}, Guilherme M. Salvador^{a,b}, Mabel C.O. Silva^a, Tássia R. Costa^{b,c}, Andreimar M. Soares^{b,c}, Marcos R.M. Fontes^{a,b,*}

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

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas, CNPq, Brazil

^c Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP, USP, Av. do Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2009

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 31 March 2010

Available online 4 April 2010

Keywords:

Phospholipase A₂

Myotoxicity

Homologue phospholipase A₂ (Lys49-PLA₂s)

Ca²⁺-binding loop

X-ray crystallography

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (Asp49-PLA₂s) are enzymes responsible for cellular membrane disruption through Ca²⁺-dependent hydrolysis of phospholipids. A class of these proteins (Lys49-PLA₂s) does not show catalytic activity but can exert a pronounced local myotoxic effect that is not neutralized by serum therapy. In this work, we present five structures of Lys49-PLA₂s from snakes of the *Bothrops* genus in apo form, complexed with PEG molecules and chemically modified by *p*-bromofenacil bromide (BPB), a classic inhibitor of PLA₂. We present herein an extensive structural analysis including: (i) the function of hydrophobic long-chain molecules as Lys49-PLA₂s inhibitors, (ii) the role of Lys122, previously indicated as being responsible for Lys49-PLA₂s catalytic inactivity and, (iii) a structural comparison of the Ca²⁺-binding loop region between Lys49 and Asp49-PLA₂s. The Lys122 analysis of 30 different monomers for apo and complexed Lys49-PLA₂s structures shows that this residue is very flexible and may bind to different carboxyl groups giving stability to the crystal structures. The structural comparisons of the Ca²⁺-binding loop region between Lys49 and Asp49-PLA₂s reveal the importance of the Tyr28 residue conservation in Asp49-PLA₂s to the integrity of this loop. The Tyr28 residue stabilizes this region by an interaction with Gly35 residue. In Lys49-PLA₂s and low-catalytic Asp49-PLA₂s this interaction does not occur, preventing the binding of Ca²⁺.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Snake venoms comprise a complex mixture of pharmacological components able to affect several biological systems. One of the main components of snake venoms is the phospholipases A₂ (PLA₂s – EC 3.1.1.4), which are small and stable molecules (14–18 kDa) found in a great diversity of organisms and biological fluids (Schalosse and Dennis, 2006). These enzymes hydrolyze fatty acids from the sn-2 position of glycerophospholipids, releasing lysophospholipids and free fatty acids, such as arachidonic acid, which are involved in many important biological processes (Tsuboi et al., 2002). Arachidonic acid molecules, for example, can be converted to eicosanoids which serve as secondary messengers in a wide range of physiological and pathological processes including sleep

regulation, immune responses, inflammation, and pain perception (Moolenaar et al., 2004). Otherwise, the lysophospholipids can serve as precursors for lipid mediators involved in cell proliferation, survival and migration and in many inflammatory processes (Moolenaar et al., 2004; Prescott et al., 2000).

The catalytic site of snake venom PLA₂ (svPLA₂s) is composed of four residues; His48, Asp49, Tyr52 and Asp99 (Magro et al., 2009). Two action mechanisms for svPLA₂s were proposed (Rogers et al., 1996; Scott et al., 1990) and in both, His48 and Asp49 play essential roles, in coordinating catalytic waters and mobilizing the Ca²⁺ ion, respectively. Furthermore, several biochemical studies demonstrated that the Ca²⁺ ion is an obligatory cofactor for sPLA₂s catalysis. Studies of its replacement by other divalent ions (Cd²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺) showed that these ions were unable to keep the substrate bound to the enzyme, with the exception of the Cd²⁺ which allows the toxin to bind to the substrate although without catalytic activity (Yu et al., 1993). This can be explained by different coordination geometries assumed by the tetrahedral intermediate due to the presence of the Cd²⁺ and Ca²⁺ ions, which determine the elec-

* Corresponding author at: Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil. Fax: +55 14 38153744.

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

¹ These authors contributed equally to this work.

trophilic behavior of the catalytic site (Yu et al., 1993). However, later experiments demonstrated that Ni^{2+} and Co^{2+} ions support a significant catalytic hydrolysis of phospholipids with determined head groups (Yu et al., 1998). These results can be also attributed to differences in coordination geometry and indicate a noteworthy plasticity of the active site environment (Yu et al., 1998).

A distinct group of svPLA₂s, known as homologue PLA₂s or Lys49-PLA₂s, exhibits a natural replacement of the key Asp49 residue by a Lys49. Lys49-PLA₂s are catalytically inactive due to their incapacity to bind the cofactor Ca^{2+} since the ϵ -amino group of Lys49 occupies exactly the position of the coordinated Ca^{2+} ion in Asp49-PLA₂ (Scott et al., 1992; Holland et al., 1990).

Additionally, site-directed mutagenesis with a Lys49-PLA₂ showed that a Lys49Asp mutant remained catalytically inactive, demonstrating that not only the single Asp49Lys replacement but also other possible structural changes are responsible for the lack of enzymatic activity. A classic crystallographic study of piratoxin II (PrTX-II), a Lys49-PLA₂ from *Bothrops pirajai* venom complexed with fatty acid, proposed that Lys122 (conserved in all Lys49-PLA₂s but rare in Asp49-PLA₂s) interacts with the carbonyl of Cys29 hyperpolarizing the peptide bond between Cys29 and Gly30. This strong interaction causes an increased affinity for the fatty acid head group, precluding the release of free fatty acid produced after an initial phospholipid hydrolysis and interruption of the catalytic cycle. Strengthening this hypothesis, a structural analysis of eight dimeric Lys49-PLA₂s found that Lys122 interacts with Cys29 in both monomers of the structures presenting ligands in their hydrophobic channels. Otherwise, in the structures with no ligands the Lys122 presents an alternative conformation in one or both monomers (Magro et al., 2003). In spite of their catalytic inactivity, Lys49-PLA₂s are responsible for inducing myonecrosis by a Ca^{2+} -independent membrane-damaging mechanism which is not efficiently neutralized by serum therapy and can lead to permanent tissue loss, disability or amputation (Gutierrez and Lomonte, 1995). Several studies have shown that segment 115–129 of the C-terminal region, which includes a variable combination of positively charged and hydrophobic residues, is responsible for this myotoxic activity. Recently, the importance of this region was reinforced by the proposal of a myotoxic site of Lys49-PLA₂s from snakes of the *Bothrops* genus that contains, besides Lys20, C-terminus residues (Lys115 and Arg118) (dos Santos et al., 2009).

Since the study with the structure of piratoxin-II (PrTX-II) complexed with fatty acid (Lee et al., 2001), a large number of structures of Lys49-PLA₂s, in native or complexed forms, have been solved (dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003; Marchi-Salvador et al., 2009; Murakami et al., 2005, 2007; Watanabe et al., 2005), thus necessitating a revision of the position of Lys122 in these new structures in an attempt to more accurately define the role of Lys122 in the catalytic inactivity of Lys49-PLA₂s. Furthermore, with this large number of structures, structural comparisons between Ca^{2+} binding loop regions of Lys49 and Asp49-PLA₂s can be very accurate and give important insights into the inability of Lys49-PLA₂s to bind Ca^{2+} cofactor. In order to carefully discuss these points, we present, in this study, five crystal structures of bothropstoxin-I, a Lys49-PLA₂ isolated from *Bothrops jararacussu* venom: two of them in native form, each with a different number of molecules in the asymmetric unit; two chemically modified by *p*-bromophenacyl bromide (BPB), a well-known inhibitor of snake venom PLA₂s, each with a different number of molecules in the asymmetric unit; and, finally, one structure co-crystallized with PEG 4000. Moreover, these complexed structures from the same protein enable a structural comparison between two different types of Lys49-PLA₂ ligands: (i) bound to the “active site” (e.g. BPB) and (ii) occupying the hydrophobic channel (e.g. PEG 4000; α -tocopherol).

2. Materials and methods

2.1. Purification and chemical modification

BthTX-I was isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom by ion-exchange chromatography on CM-Sepharose (Homs-Brandeburgo et al., 1988). Modification of His48 with *p*-bromophenacyl bromide (BPB) was carried out as previously described (Diaz-Oreiro and Gutierrez, 1997). Briefly, approximately 3 mg of the BthTX-I was dissolved in 1 ml of 100 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0; and 150 μl of BPB solution (0.8 mg. ml^{-1} in ethanol) was added. The mixture was incubated for 24 h and the excess reagent was removed by ultrafiltration, followed by lyophilization.

2.2. Dynamic light scattering

The dynamic light scattering (DLS) measurements were performed with native BthTX-I at the crystallization temperature (291 K) at the concentration of 3.2 mg. ml^{-1} using a DynaPro TITAN instrument (Wyatt Technology). The results were analyzed with the Dynamics v.6.10 software. The data were measured one hundred times in triplicate.

2.3. Crystallization

Crystallization experiments were performed with lyophilized samples of native BthTX-I and BthTX-I/BPB dissolved in ultra-pure water at the concentration of 12 mg. ml^{-1} . Crystals of these complexes were obtained by the conventional hanging-drop vapor-diffusion method (McPherson, 2003) using the sparse-matrix method (Jancarik and Kim, 1991) with Crystal Screen I (Hampton Research). Crystals of the apoBthTX-I were obtained with: one (apo-mBthTX-I) and two (apo-dBthTX-I) molecules in the asymmetric unit, BthTX-I chemically modified by *p*-bromophenacyl bromide (BPB) also with one (mBthTX-I/BPB) and two (dBthTX-I/BPB) molecules in the asymmetric unit and BthTX-I complexed with PEG 4000 (BthTX-I/PEG4K). Crystallization conditions are shown in Table 1.

2.4. X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data were collected using a synchrotron-radiation source (MX1 and MX2 stations – LNLS, Campinas, Brazil) with a MAR CCD imaging-plate detector (MAR Research). Crystals were mounted in a nylon loop and flash cooled in a stream of nitrogen at 100 K using no cryoprotectant. Data were processed using the HKL program package (Otwinowski and Minor, 1997). Data-processing statistics are presented in Table 1.

2.5. Structure determination and refinement

The structures were solved by the molecular replacement method using the program AmoRe (Navaza, 1994) and coordinates of Lys49-PLA₂ PrTX-I (PDB ID 2q2j) (dos Santos et al., 2009). The model choice was based on the best results of correlation and *R*-factor from the AmoRe program. After a cycle of simulated annealing refinement using the CNS program (Brunger et al., 1998), the electron densities were inspected and the amino acid sequence was inserted. The modeling process was always performed by manual rebuilding with the program Coot (Emsley and Cowtan, 2004). Electron density maps calculated with coefficients $2|F_{\text{obs}}| - 1|F_{\text{calc}}|$ and simulated annealing omit maps calculated with analogous coefficients were generally used. The models were improved, as judged by the free *R*-factor (Brunger et al., 1998), through rounds of crystallographic refinement (positional and restrained isotropic

Table 1
Crystallization and X-ray data collection parameters.

	apo-mBthTX-I	apo-dBthTX-I	mBthTX-I/BPB	dBthTX-I/BPB	BthTX-I/PEG4K
Crystallization conditions	20% (w/v) isopropanol; 18% (w/v) PEG 4000; 100 mM Sodium Citrate pH 6.0	26% (w/v) PEG 4000; 200 mM Lithium Sulfate; 100 mM Tris HCl pH 8.5	20% (w/v) isopropanol; 23% (w/v) PEG 4000; 100 mM Sodium Citrate pH 6.0	20% (w/v) isopropanol; 23% (w/v) PEG 4000; 100 mM Sodium Citrate pH 6.1	29% (w/v) PEG 4000; 200 mM Lithium Sulfate; 100 mM Tris HCl pH 8.5
Crystallization temperature (K)	283	298	283	291	291
Unit cell (Å)	$a = 57.8$; $b = 80.1$; $c = 67.8$	$a = b = 55.671$; $c = 127.836$; $\gamma = 120^\circ$	$a = 49.2$; $b = 65.8$; $c = 85.4$	$a = 50.6$; $b = 62.4$; $c = 87.1$	$a = 38.5$; $b = 70.8$; $c = 43.8$; $\beta = 102.2^\circ$
Space group	C222 ₁	P3 ₁ 21	C222 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Matthews coefficient	2.87	2.10	2.74	2.57	2.14
V_M (Å ³ Da ⁻¹)					
Molecules in ASU	1	2	1	2	2
Solvent content (%)	57.18	41.48	55.24	51.84	42.53
Resolution (Å)	50–1.82 (1.90–1.82) ^a	40–1.91 (2.00–1.91) ^a	18.42–1.48 (1.53–1.48) ^a	29.40–2.28 (2.36–2.28) ^a	50–1.55 (1.62–1.55) ^a
Redundancy	3.1 (2.7) ^a	3.0 (2.4) ^a	6.1 (6.1) ^a	4.2 (4.1) ^a	3.3 (2.2) ^a
Completeness (%)	97.3 (92.5) ^a	92.3 (91.6) ^a	88.7 (88.4) ^a	93.3 (94.0) ^a	98.2 (99.4) ^a
R_{merge}^b	6.4 (30.9) ^a	12.8 (47.3) ^a	9.1 (49.1) ^a	4.7 (23.5) ^a	6.7 (43.8) ^a
$I/\sigma(I)$	15.77 (3.19) ^a	8.05 (1.89) ^a	10.45 (3.08) ^a	26.26 (4.81) ^a	12.73 (1.82) ^a

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

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

Table 2
Structure refinement statistics.

	apo-mBthTX-I	apo-dBthTX-I	mBthTX-I/BPB	dBthTX-I/BPB	BthTX-I/PEG4K
Resolution (Å)	50–1.82 (1.90–1.82) ^a	40–1.91 (2.00–1.91) ^a	18.42–1.48 (1.53–1.48) ^a	29.40–2.28 (2.36–2.28) ^a	50–1.55 (1.62–1.55) ^a
Unique reflections	14091(1647) ^a	17151(2081) ^a	22361 (2212) ^a	12419 (1202) ^a	32689 (4127) ^a
Completeness (%)	97.3 (92.5) ^a	92.3 (91.6) ^a	88.7 (88.4) ^a	93.3 (94.0) ^a	98.2 (99.4) ^a
R_{cryst}^b (%)	15.8	22.3	20.6	23.5	20.0
R_{free}^c (%)	21.2	25.6	22.3	25.4	24.6
Number of non-hydrogen atoms					
Protein	953	1906	953	1873	1906
<i>p</i> -Bromophenacyl bromide	–	–	10	20	–
PEG molecule	–	–	–	–	70
Isopropanol	–	–	4	4	–
Sulfate	–	–	–	–	10
Lithium	–	1	–	–	–
Waters	260	190	350	128	241
Mean B -factor (Å ²) ^d					
Overall	30.8	36.527	27.88	48.73	29.1
Mean G -factor ^e	0.4	1.1	0.7	2.2	0.9
Ramachandran plot (%) ^f					
Residues in favored region	95.8	96.2	93.3	94.1	97.1
Residues in allowed region	4.2	3.8	6.7	3.8	2.9
Residues in outlier region	–	–	–	2.1	–

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

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

^c R_{free} is equivalent to R_{cryst} , but calculated with reflections (5%) omitted from the refinement process.

^d Calculated with CNS program (Brunger et al., 1998).

^e Calculated with the PROCHECK program (Laskowski et al., 1993).

^f Calculated with RAMPAGE program (Lovell et al., 2003).

individual B -factor refinement, with an overall anisotropic temperature factor and bulk solvent correction) using the REFMAC (Mursudov et al., 1997) and CNS (Brunger et al., 1998) programs. The dictionaries of residue His48–BPB employed by CNS, REFMAC and Coot programs were obtained from the structure of BthA-I/BPB (PDB ID 1Z76) (Magro et al., 2005). Ions and solvent molecules were also added and refined with the program REFMAC. The refinement statistics for the final models are shown in Table 2. In the structure of dBthTX-I/BPB, substitution of some residues were necessary due to the lack of electron density in side chains (monomer A: Lys36 → Gly, Lys106 → Ala, Lys122 → Gly and Lys127 → Gly; monomer B: Lys69 → Ala and Lys122 → Ala). The quality of the models was checked with the RAMPAGE program (Lovell et al., 2003). The contacts between the proteins and the ligands were analyzed with the LIGPLOT program (Wallace et al., 1995). The

coordinates were deposited in the Protein Data Bank (PDB) under the identification codes 3I3I (apo-mBthTX-I), 3HZD (apo-dBthTX-I), 3HZW (dBthTX-I/BPB), 3IO3 (mBthTX-I/BPB) and 3IQ3 (BthTX-I/PEG4K).

2.6. Comparative analysis

Molecular comparisons of the structures were performed using the “O” program (Jones et al., 1991) with only the C_α coordinates. The structures of BaspTX-II (myotoxin II from *Bothrops asper*) in its native form (PDB ID 1CLP) (Arni et al., 1995) and complexed with suramin (PDB ID 1Y4L) (Murakami et al., 2005), BnSP-6 (myotoxin I from *Bothrops pauloensis*; PDB ID 1PC9) (Magro et al., 2003), BnSP-7 (myotoxin II from *Bothrops pauloensis*; PDB ID 1PA0) (Magro et al., 2003), BthTX-I (myotoxin I from *Bothrops jararacussu*) complexed

with α T (PDB ID 3CXI) (dos Santos et al., 2009), MjTX-II (myotoxin II from *Bothrops moojeni*) complexed with stearic acid (PDB ID 1XXS) (Watanabe et al., 2005), PrTX-I (myotoxin I from *Bothrops pirajai*) in its native form (PDB ID 2Q2J) and complexed with α T (PDB ID 3CYL) (dos Santos et al., 2009), PrTX-II (myotoxin II from *Bothrops pirajai*) with a natural fatty acid (PDB ID 1QLL) (Lee et al., 2001), BthA-I (acid phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*; PDB ID 1U73) (Magro et al., 2005), acid phospholipase A₂ from *Gloydius halys* (PDB ID 1PSJ) (Wang et al., 1996), DPLA₂ (phospholipase A₂ from *Daboia russellii pulchella*; PDB ID 1FB2) (Chandra et al., 2001) and Beta2-Bungarotoxin (phospholipase A₂ from *Bungarus multicinctus*; PDB ID 1BUN) (Kwong et al., 1995) were used in the comparative analysis. All the figures were generated by the Pymol (DeLano, 2002) and “O” (Jones et al., 1991) programs. Analysis of the quaternary assemblies and interfacial contacts of the crystallographic models were performed using the online interactive tool PISA (Krissinel and Henrick, 2007) available at the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk>). Two different angles, θ_A (aperture angle) and θ_T (torsional angle) were used to quantify the oligomeric changes between the apo and complexed forms according to a model previously proposed (dos Santos et al., 2009). In this model, the coordinates (x, y, z) of C α atoms from the α -helices h2 and h3 were used to define two vectors (A and B) whose scalar product defined the aperture angle (θ_A). The torsional angle (θ_T) is calculated by using the normal plane formed by the vectors A and B from one monomer and the vector B from the other monomer.

3. Results and discussion

3.1. Overall structures

The crystals diffracted in the range between 1.48 Å and 2.28 Å (Table 2). The two structures that present one molecule in the asymmetric unit belong to the C222₁ space group. The structures that possess two molecules in the asymmetric unit belong to: (i) P3₁2₁ space group for native structures and (ii) P2₁2₁2₁ or P2₁

space groups for complexed structures. This feature follows the pattern previously observed in dimeric bothropic Lys49-PLA₂s (dos Santos et al., 2009). All the refinements converged to final R values between 15.8% and 23.5% (R_{free} values between 21.2% and 25.6%). The final models present a better stereochemical quality than expected for structures with the same resolution as indicated by the overall G-factor and by Ramachandran plot analysis (Table 2). The five structures have seven disulfide bridges in each monomer with the following structural features: (i) an N-terminal α -helix; (ii) a “short” helix, (iii) a Ca²⁺ binding loop; (iv) two anti-parallel α -helices (2 and 3); (v) two short strands of anti-parallel β -sheet (β -wing); and (vi) a C-terminal loop (Fig. 1), similarly to all the other class II PLA₂s.

In both BthTX-I/BPB structures, BPB molecules are covalently bound to the N81 atom of His48 residue from all monomers (Fig. 2A) and the phenacyl group of BPB molecule extends along the hydrophobic channel of the proteins, engaging hydrophobic interactions with Leu5 and Gly30. Additionally, BPB molecules also interact (distance <4.0 Å) with Tyr22, Gly23, Cys45 and Lys49 for dBthTX-I/BPB and Gly23, Gly30, Lys49 and one isopropanol molecule for mBthTX-I/BPB (Fig. 3). The electron density map for BthTX-I/PEG4K structure showed clear positions for three PEG molecules (Fig. 2B). Two of them are positioned similarly to PEG molecules in the BthTX-I/suramin structure and to α -tocopherol in BthTX-I/ α T and PrTX-I/ α T structures, i.e., interacting with a large number of residues along the hydrophobic channel of the protein (Fig. 4). The third PEG molecule, in a position similar to the PEG molecule in BthTX-I/ α T structure, interacts (distance <4.0 Å) with Lys7, Glu10, Gly13, Tyr76 and Trp77 of monomer B (Fig. 4).

3.2. Oligomeric assembly

The results of dynamic light scattering experiments at 291 K (crystallization temperature) with apo-BthTX-I indicated a mean hydrodynamic radius (R_H) of 2.5 nm with a polydispersity of 10.7%. This R_H value corresponds to a molecular weight of approximately 27 kDa and is, thus, equivalent to a dimer.

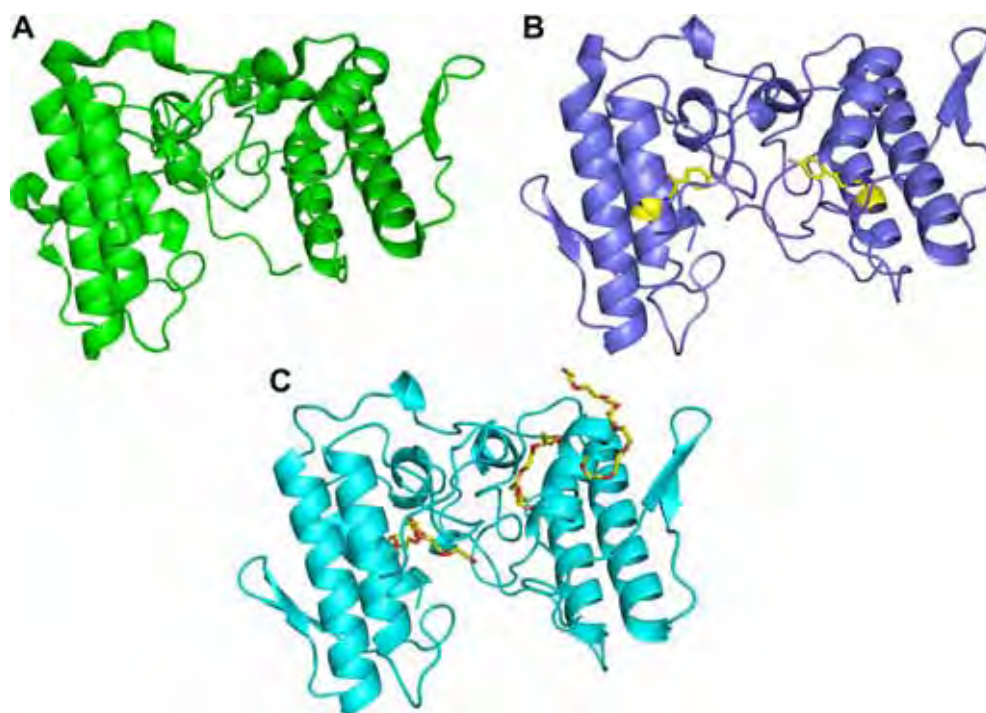


Fig. 1. Dimeric structures of (A) apo-dBthTX-I, (B) dBthTX-I/BPB and (C) BthTX-I/PEG4K show as a cartoon representation. The BPB and PEG molecules (yellow) are showed by sticks. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

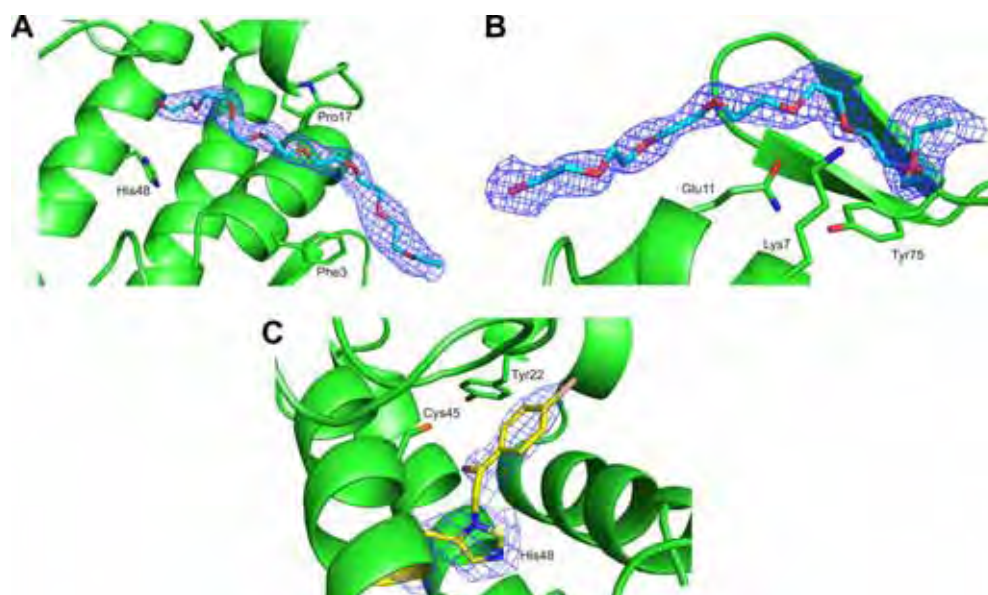


Fig. 2. Electron density difference maps for the region corresponding to (A) BthTX-I/PEG4K hydrophobic channel (B) BthTX-I/PEG4K around Lys7 residue region and (C) mBthTX-I/BPB "active site" region. The maps were calculated with coefficients $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ and contoured at 1.5 standard deviations. The ligands molecules were not considered electron density maps calculation and were drawn for clarity. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

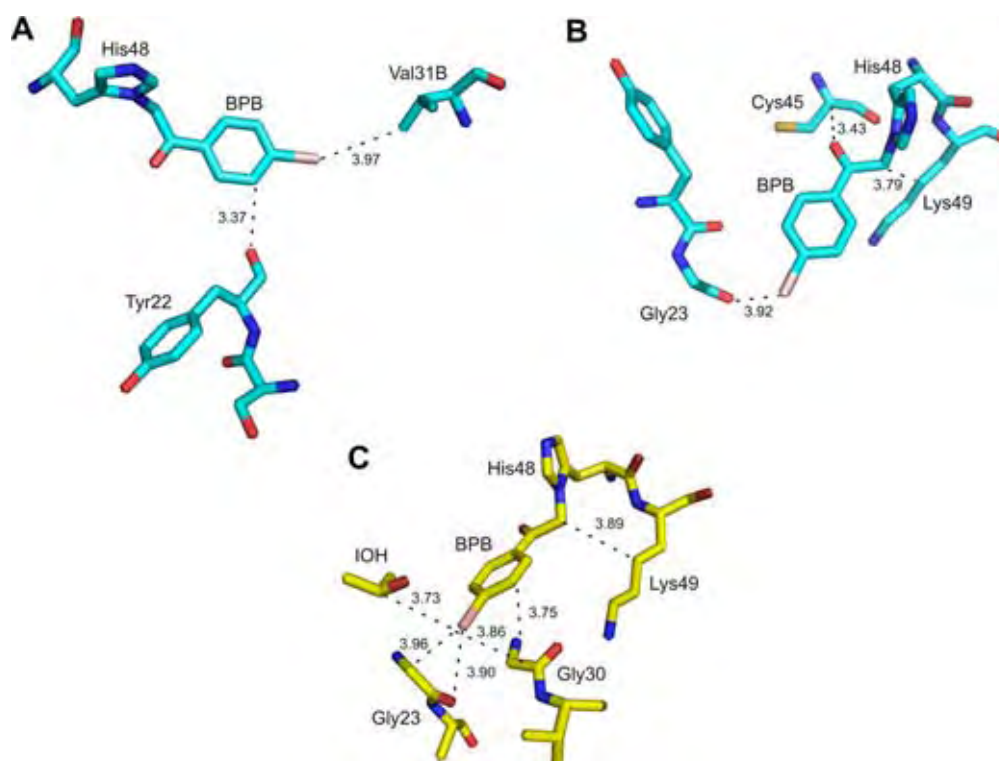


Fig. 3. Interaction between BPB molecules and the residues of dBthTX-I/BPB and mBthTX-I/BPB structures. The distances between the atoms are shown. (A) Monomer A from dBthTX-I/BPB interactions. Tyr22, Val31 and His48 residues are labeled. (B) Monomer B from dBthTX-I/BPB interactions. Gly23, Cys45, His48 and Lys49 residues are labeled. (C) Monomer from mBthTX-I/BPB interactions. Gly23, Gly30, His48, Lys49 residues and propanol molecule are labeled. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

Although apo-mBthTX-I and mBthTX-I/BPB present a monomer in the asymmetric unit, the examination of their unit-cell packing using the PISA software (Krissinel and Henrick, 2007) shows a dimeric conformation stable in solution for both structures. The apo-mBthTX-I presents a complexation significance score (CSS) of 1.0, an interfacial area of $528.3 \text{ \AA}^2$, $G^{\text{int}} = -13.0 \text{ kcal/mol}$ and $G^{\text{diss}} = 2.0 \text{ kcal/mol}$ while for mBthTX-I/BPB the values are CSS of

0.565, interface area of $683.2 \text{ \AA}^2$, $G^{\text{int}} = -27.6 \text{ kcal/mol}$ and $G^{\text{diss}} = 5.7 \text{ kcal/mol}$. The apo-dBthTX-I, dBthTX-I/BPB and BthTX-I/PEG4K structures, which present a dimer in the asymmetric unit, also exhibit the same dimeric conformation that is stable in solution according to the PISA software with CSS, interfacial area, G^{int} and G^{diss} values compatible with a biological dimer (data not shown). The assembly with the higher complexation score is a

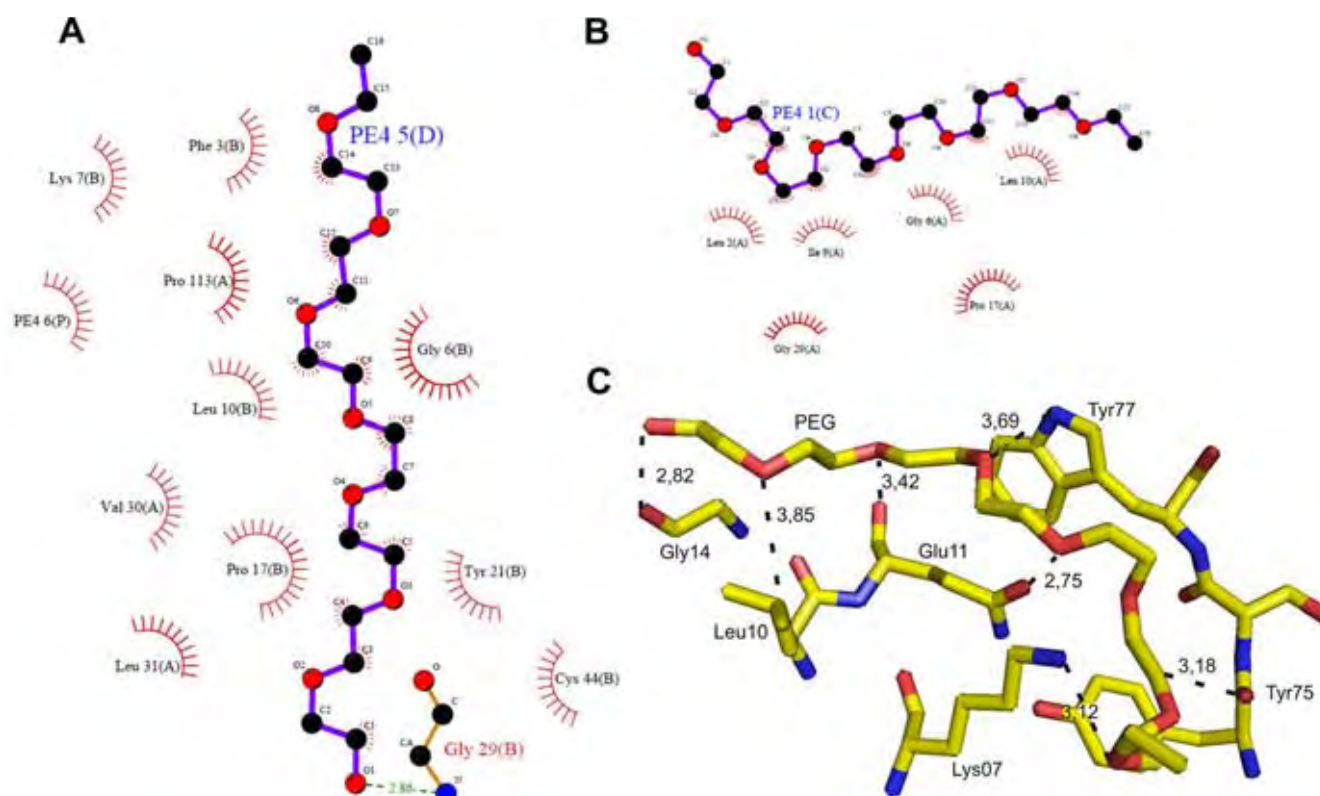


Fig. 4. Interaction between PEG molecules and the residues of BthTX-I/PEG4K structures. (A,B) The hydrophobic interactions of PEG molecules that occupies the hydrophobic channel of the structure. Drawn using Ligplot program (Wallace et al., 1995). (C) Interactions of dBthTX-I/PEG4K with the PEG molecule that is exposed to the solvent. The distances between the atoms are shown. Lys7, Leu10, Glu11, Gly14 and Tyr75 are labeled. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

common feature for all Lys49-PLA₂s lattices solved up to the present (dos Santos et al., 2009). This structural conformation is known as “alternative dimer” and was proposed because only this assembly is possible for the binding mode of suramin (Murakami et al., 2007) and α -tocopherol (dos Santos et al., 2009) to bothropic Lys49-PLA₂s. In contrast to other Lys49-PLA₂ structures denominated “conventional dimer” (Arni et al., 1995, 1999; da Silva Giotto et al., 1998; de Azevedo et al., 1999; Lee et al., 2001; Magro et al., 2003; Watanabe et al., 2005) solved by X-ray crystallography whose interfacial area, G^{int} and G^{diss} values are incompatible with a biological dimer (dos Santos et al., 2009). Small angle X-ray scattering experiments and molecular dynamic simulations also showed that this “alternative dimer” is the configuration found in solution (Murakami et al., 2007).

3.3. Comparison of BthTX-I monomers

Superposition of dBthTX-I/BPB monomers and BthTX-I/PEG4K monomers resulted in C_{α} atom r.m.s. deviations of 0.67 Å and 0.79 Å, respectively, while for apo-dBthTX-I this value was 1.05 Å. These values are comparable to other Lys49-PLA₂s (dos Santos et al., 2009) where a pattern was observed among apo forms, which presented an r.m.s.d. around 1.0 Å while for complexed structures these values are significantly lower. These higher values for apo forms occur mainly due to differences in their C-termini, demonstrating higher conformational flexibility of this region. Table 3 catalogs r.m.s. deviations after the superposition of C_{α} atoms between monomers of the five BthTX-I structures presented herein. By comparing the monomers from different dimeric structures (apo-dBthTX-I, dBthTX-I/BPB and BthTX-I/PEG4K), it can be observed that one monomer (called herein monomer B) is always more similar to the equivalent monomer of the other structure.

Table 3

Superposition between monomers of BthTX-I structures (r.m.s. deviation (Å) of C_{α} atoms).

		apo-dBthTX-I	
		Monomer A	Monomer B
BthTX-I/PEG4K	Monomer A	1.131	0.647
	Monomer B	1.020	0.563
dBthTX-I/BPB	Monomer A	0.926	0.703
	Monomer B	0.866	0.814
apo-dBthTX-I	Monomer A	-	1.054
	Monomer B	1.054	-
apo-mBthTX-I mBthTX-I/BPB		1.123	0.681
		1.141	0.521

In all cases, the main differences occur in three regions of each monomer: Ca^{2+} binding loop (residues 29–34), the loop after the β -wing (residues 85–90) and in the C-termini (117–130) (Supplementary Fig. 1), although the major differences are between the C-terminal and Ca^{2+} binding loop regions in the A monomers. The superposition between the C-termini (residues 117–130) of monomers A from apo-dBthTX-I and BthTX-I/PEG4K resulted in an r.m.s. deviation of 2.40 Å versus 1.24 Å for the monomers B. Similarly, the same superposition between the Ca^{2+} binding loop regions resulted in deviations of 1.24 and 0.33 Å, respectively, for the monomers A and B. Comparing apo-dBthTX-I and dBthTX-I/BPB structures, approximately the same differences were also observed after superposition of C-termini and Ca^{2+} binding loop regions between the different monomers. The superposition between the C-termini of the A monomers resulted in an r.m.s. deviation of 1.91 Å versus 1.09 Å for B monomers. For Ca^{2+} binding loop region,

the superposition resulted in respective deviations of 1.20 and 0.65 Å, respectively, for the A and B monomers.

These structural changes were probably induced by the ligands (BPB or PEG molecules) leading to a new oligomeric conformation where some new interfacial interactions were established. For apo-dBthTX-I, one hydrogen bond was observed between its monomers (Val31:Lys69) whereas in the dBthTX-I/BPB and BthTX-I/PEG4K structures two new interchain hydrogen bond were established (Asn17:Tyr119 and Tyr119:Tyr119). These hydrogen bonds were induced by the rearrangement of the C-terminus of monomer A which increases the symmetry between monomers when the BPB and the PEG molecules are present at the “active site” of the protein as observed for PrTX-I/ α T and PrTX-I/BPB complexed structures (dos Santos et al., 2009; Marchi-Salvador et al., 2009).

4. Discussion

4.1. The “two-angle model” applied to BthTX-I structures

Several experiments on bothropic Lys49-PLA₂s, including ones utilizing electrophoresis, spectroscopy (Arni et al., 1999; da Silva Giotto et al., 1998), small angle X-ray scattering (Murakami et al., 2007) and dynamic light scattering (the present article), demonstrated that bothropic Lys49-PLA₂s are dimeric proteins in solution. Furthermore, the dimeric state is also found *in vivo*, and is stable even upon heating in the presence of β -mercaptoethanol (da Silva Giotto et al., 1998; Soares et al., 2000). pH-induced dissociation studies also demonstrated a considerable decrease of membrane-damaging activity after the dimeric dissociation (Angulo et al., 2005).

Since the BthTX-I structure was solved for the first time in 1998 (da Silva Giotto et al., 1998), the oligomeric assembly for bothropic Lys49-PLA₂s has remained the main issue in several other structural articles involving this class of proteins (Magro et al., 2003; Watanabe et al., 2005). In this precursor study on BthTX-I, its proposed molecular hinge model (aperture angle) was based on only two configurations of BthTX-I (“open” and “closed”). This proposal was subsequently revised (Magro et al., 2003) using seven different structures at higher resolution. More recently, a useful tridimensional configuration model between the monomers has been proposed based on two angles: θ_T (torsional angle) and θ_A (aperture angle) (dos Santos et al., 2009). This two-angle model was established for the “alternative dimer” by the observation that the Lys49-PLA₂s complexed to any ligand present a rearrangement of the C-terminus of one monomer thus increasing the symmetry between the two monomers and aligning them in the same plane. This alignment results in lower torsional and higher aperture angles for complexed structures. Then, when these angles are calculated for both complexed and apo Lys49-PLA₂s, their oligomeric conformation can be divided into two classes: apo and complexed structures (dos Santos et al., 2009). In the case of dBthTX-I/BPB and BthTX-I/PEG4K structures the calculated angles are, respectively, $\theta_T = 53^\circ$ and $\theta_A = 23^\circ$; $\theta_T = 40^\circ$ and $\theta_A = 28^\circ$. These values are similar in the BthTX-I/ α T and other complexed structures including PrTX-I/ α T, MjTX-II/stearic acid, and BaspTX-II/suramin (dos Santos et al., 2009). By contrast, the torsional/aperture angles for apo-dBthTX-I are, respectively, 60° and 7° , which differ greatly from those of the complexed structures but are very similar to the angles found in other apo structures (PrTX-I, BnSP-7, and BnSP-6) (dos Santos et al., 2009).

The disorder in apo Lys49-PLA₂ C-termini and the action of a ligand to order this region by increasing the symmetry between the monomers have been observed in bothropic Lys49-PLA₂s (dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003). The reorganization of the C-terminal region of one monomer when a ligand is present at the

“active site” (e.g. BPB molecule) or hydrophobic channel (e.g. PEG 4000) induces a better order at its C-terminus leading to the establishment of a new interchain hydrogen bond between Tyr119 residues. This phenomenon has been observed in both dBthTX-I/BPB and BthTX-I/PEG4K structures and is also a common feature among the complexed bothropic Lys49-PLA₂s and probably is an important characteristic for the myotoxicity of these toxins (dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003). Site-directed mutagenesis experiments also support this hypothesis since a significant decrease in the myotoxic activity was observed after Y119A mutant was tested *in vivo* (Chioato et al., 2007).

4.2. The role of hydrophobic long-chain molecules for Lys49-PLA₂s

The structures of Piratoxin-II from *B. pirajai* (PrTX-II) and NumTX-I from *B. nummifer* revealed electron densities that were interpreted as fatty acids within the hydrophobic channel leading to the active site (de Azevedo et al., 1999; Lee et al., 2001). More recently, the structure of the complex MjTX-II bound to a fatty acid (stearic acid) was solved (Watanabe et al., 2005). This molecule was found occupying the hydrophobic channel for PrTX-II, NumTX-I, and MjTX-II structures, despite the fact that MjTX-II was co-crystallized with the fatty acid, and NumTX-I and PrTX-II were interpreted as a fatty acid since these molecules were not added to the crystallization solution (Fig. 5). However, the structures of the complexes between the putative fatty acid bound to the PrTX-II and the stearic acid bound to MjTX-II present significant differences. In contrast to the PrTX-II structure, no water molecule was found bound to the stearic acid head group in the MjTX-II structure. Instead, the carboxyl oxygens of the stearic acid form hydrogen bonds with His 48 and Gly 30 and occupy a position similar to that of a solvent molecule in the PrTX-II structure. Due to the inclusion of a water

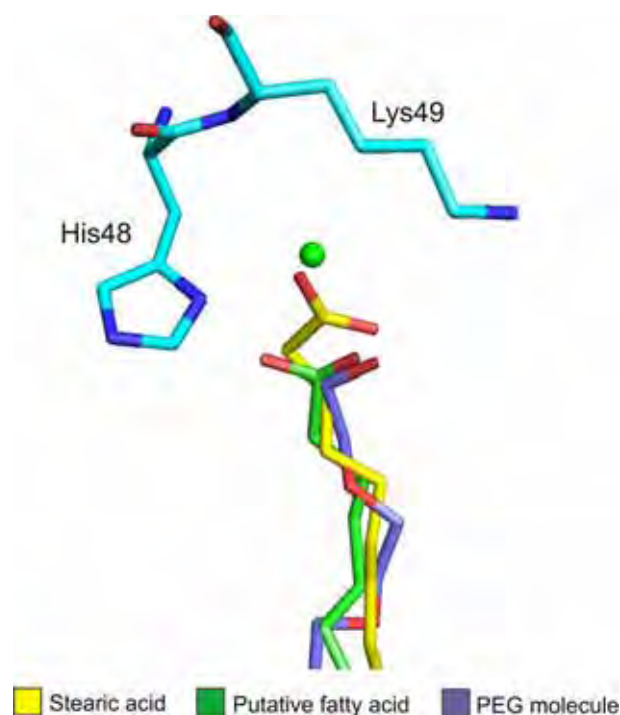


Fig. 5. Superposition of PEG molecule (dark blue) from dBthTX-I/PEG4K structure, stearic acid (yellow) from MjTX-II/stearic acid structure and putative fatty acid (green) from PrTX-II/fatty acid structure in the “active site” region. His48 and Lys49 are shown by sticks. The water molecule in the PrTX-II/fatty acid structure (W39) is shown as a green sphere. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

Table 4

The role of Lys122 residue for apo and complexed Lys49-PLA₂s. B-factor side chains, electron density and polarization of Cys29–Gly30 analyses.

		B-factor average of all protein atoms (Å ²)	B-factor average of Lys122 side chain atoms (Å ²)		Electron density for Lys122 side chain (cut-off 1.2σ)		Polarization of Cys29–Gly30 peptide bond	
			Monomer A	Monomer B	Monomer A	Monomer B	Monomer A	Monomer B
Apo	dBthTX-I	41.1	62.9	31.7	Yes	Yes	No	Yes
	mBthTX-I	27.8	60.0	–	Yes	–	No	–
	PrTX-I	34.1	42.4	31.2	Yes	Yes	No	Yes
	BaspTX-II	12.1	27.1	23.0	^a	^a	Yes	No
	BnSP-7	30.5	51.7	55.4	Yes	Yes	No	No
	BnSP-6	38.3	47.5	68.9	Yes	Yes	Yes	No
Complexed	dBthTX-I/BPB	48.7	–	–	No	No	No	No
	mBthTX-I/BPB	29.2	26.1	–	Yes	–	Yes	–
	BthTX-I/PEG4K	27.8	37.5	45.0	Yes	Yes	Yes	No
	BthTX-I/αT	30.4	–	47.2	No	Yes	No	No
	PrTX-I/BPB	48.9	66.9	65.1	Yes	Yes	No	No
	PrTX-I/αT	22.7	37.7	38.1	Yes	Yes	No	No
	PrTX-II/fatty acid	31.1	32.8	32.7	^a	^a	Yes	Yes
	MjTX-II/stearic acid	33.6	39.1	36.0	Yes	Yes	Yes	Yes
	BaspTX-II/suramin	24.0	32.5	48.1	Yes	Yes	Yes	No
	BthTX-I/PEG 400	41.1	60.4	51.2	Yes	Yes	No	Yes

^a Structure factors values not available in PDB Data Bank.

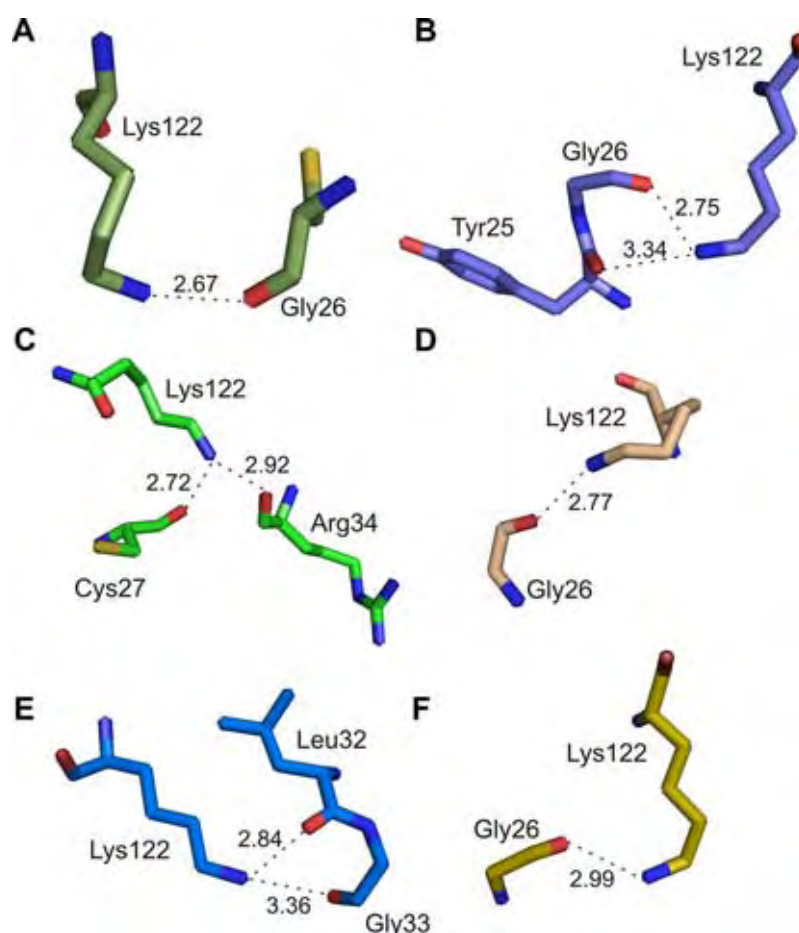


Fig. 6. Interactions of Lys122 with several residues in different Lys49-PLA₂s structures. The distances between the atoms are shown. (A) apo-mBthTX-I. (B) mBthTX-I/BPB. (C) BaspTX-II/Suramin. (D) apo-BaspTX-II. (E) BnSP-7. (F) BnSP-6. Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

molecule, the supposed fatty acid in the PrTX-II is shifted out one carbon position in relation to stearic acid of the MjTX-II (Fig. 5).

Both polyethylene glycol (PEG3350 or PEG4000) and fatty acid molecules are, in general, structurally similar. The main difference between them is that the fatty acid polar head has two oxygen atoms while the PEG molecule has only one oxygen atom. Then,

given that the PrTX-II was crystallized in the presence of PEG3350 and the interaction of ligand with the “active site” occurred by means of a water molecule (Fig. 5), we suggest the presence of a PEG3350 instead of a fatty acid molecule in the hydrophobic channel where the water molecule would be the oxygen head of PEG molecule. In contrast, NumTX-I and MjTX-II struc-

Table 5

Superposition between Ca²⁺ binding loop regions (residues 26–34) between monomers of snake venom PLA₂s (r.m.s. deviation (Å) of C_α atoms).

		apo-dBthTX-I
Lys49	PrTX-I	0.37
	BnSP-7	0.49
	BnSP-6	0.49
	PrTX-II/fatty acid	0.61
	MjTX-II/fatty acid	0.61
	BthTX-I/αT	0.41
	PrTX-I/αT	0.41
	BthTX-I/PEG4K	0.32
	BaspTX-II	1.09
	godMT-II	1.52
Asp49	BthA-I-PLA ₂	1.89
	Acid-PLA ₂	1.75
	DPLA ₂	1.61
	β2-Bungarotoxin	1.71
Asp49 ^a	BthTX-II	2.15
	PrTX-III	3.18

^a Asp49-PLA₂s with reduced catalytic activity.

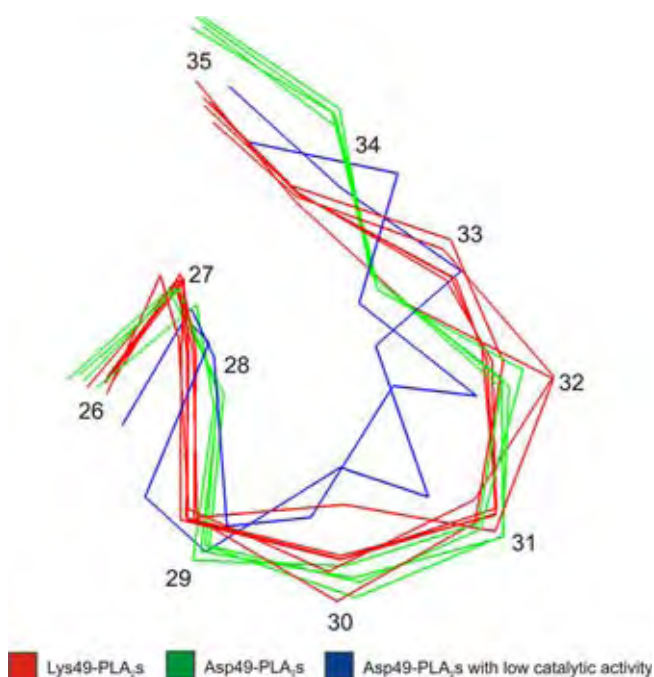


Fig. 7. C_α superposition of Ca²⁺-binding loop region of Lys49-PLA₂s (red) and Asp49-PLA₂s (green) and low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s (blue) structures. The numbers correspond to the residues that form the Ca²⁺-binding loop region. The Asp49-PLA₂s (green) are represented by BthA-I-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID 1U73), Acid Phospholipase from *Gloydius halys* venom (PDB ID 1PSJ), DPLA₂ from *Daboia russelli pulchella* venom (PDB ID 1FB2) and β-2 Bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom (PDB ID 1BUN). The low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s (blue) are represented by BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID 2OQD) and PrTX-III from *Bothrops pirajai* venom (PDB ID 1GMZ). The Lys49-PLA₂s (red) are represented by apo-dBthTX-I from *Bothrops jararacussu* venom (this work, PDB ID 3HZD), apo-PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom (PDB ID 2Q2J), BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* venom (PDB ID 1PAO), apo-BaspTX-II from *Bothrops asper* venom (PDB ID 1CLP), godMT-II from *Cerrophidion goodmani* venom (PDB ID 1GOD) and Anum-II from *Atropoides nummifer* venom (PDB ID 2AOZ). Drawn using “O” (Jones et al., 1991) and PyMOL (DeLano, 2002) programs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

tures were not crystallized in the presence of polyethylene glycol, thus enhancing the chance of binding of fatty acid in the hydrophobic channel. This doubt only can be resolved with new crystallization experiments that utilize PrTX-II in the absence of PEG3350 or

Asp49	Apispis2	:	GCYCGWGGQ	GR	26	28	35
	Tfla4	:	GCYCGWGGRGK				
	Ghal7	:	GCYCGWGGQ	GR			
	Ghal1	:	GCYCGGGGQ	GR			
	Beryl	:	GCYCGSGGQ	GR			
	Bsch3	:	GCYCGAGGQ	GK			
	Tfla5	:	GCYCGKGGRG				
	Ghal3	:	GCYCGSGGQ	GK			
	Dacu2	:	GCYCGWGGRGW				
	Pmuc1	:	GCYCGWGGQ	GK			
	Tgra4	:	GCYCGKGGH	GR			
	Ghal6	:	GCYCGSGGR	GK			
	Bsch2	:	GCYCGWGGQ	GQ			
	Cgod4	:	GCYCGWGGQ	GK			
	Ookil	:	GCYCGAGGQ	GR			
	Dacul	:	GCYCGWGGH	GR			
Lys49	Ghal8	:	GCYCGWGGQ	GR			
	Bjar3	:	GCYCGWGGQ	GQ			
	Basp2	:	GCYCGWGGQ	GQ			
	Bjar1	:	GCYCGLGGQ	GQ			
					26	28	35
	Cgod1	:	GCNCGVGS	R	GK		
	Pmuc2	:	LCNCGVGN	R	GK		
	Crhol	:	GCNCGVGN	R	GK		
	Bsch1	:	GCNCGVGR	R	GQ		
	Apispis1	:	GCNCGWGH	R	GQ		
	Tfla1	:	GCNCGVGR	R	GK		
	Basp1	:	GCNCGVL	R	GK		
	Bpir1	:	GCNCGVL	R	GK		
	Ooki2	:	GCNCGM	R	RR		
	Basp3	:	GCNCGVL	R	GK		
	Anum1	:	GCNCGVGS	R	GK		
Dacu3	:	GCNCGVGR	R	GE			
Bmoo2	:	GCNCGVGR	R	GK			
Tgra2	:	GCNCGP	G	RR	RK		
Bmool	:	GCNCGVL	R	GK			
Bpaul	:	GCNCGVL	R	GQ			
Tgra1	:	GCNCGP	G	RR	RK		
Batr1	:	GCNCGVGR	R	GK			
Bpir2	:	GCNCGVL	R	GK			
Bjar4	:	GCNCGVL	R	GK			

Fig. 8. Amino acid sequence alignment of Ca²⁺-binding loop region of several Asp49-PLA₂s and Lys49-PLA₂s (codes used in alignment and its NCBI entries are shown Supplementary Table 1). Residues of the beginning of Ca²⁺-binding loop (residue 26) and involved in stabilization of this region (residues 28 and 35) are highlighted.

in the presence of a specific fatty acid molecule. To corroborate this data, the BthTX-I/PEG4K structure was solved to a high resolution (1.5 Å) and also presented electron densities for both monomers within the hydrophobic channel, which could be interpreted ambiguously as polyethylene glycol 4000 molecules.

The structures of α-tocopherol bound to BthTX-I/αT and PrTX-I/αT also revealed the high affinity of Lys49-PLA₂s for long-chain hydrophobic molecules by the hydrophobic channel (dos Santos et al., 2009). Recently, the presence of two different binding regions has been proposed for Lys49-PLA₂s and membranes: the “active site/hydrophobic channel” and the “myotoxic site” (Marchi-Salvador et al., 2009). In this hypothesis the hydrophobic channel would be the anchor by which the protein may bind to the membrane phospholipids while the myotoxic site would be responsible for the membrane destabilization. This suggestion may explain why the Lys49-PLA₂s have high affinity for long-chain hydrophobic molecules.

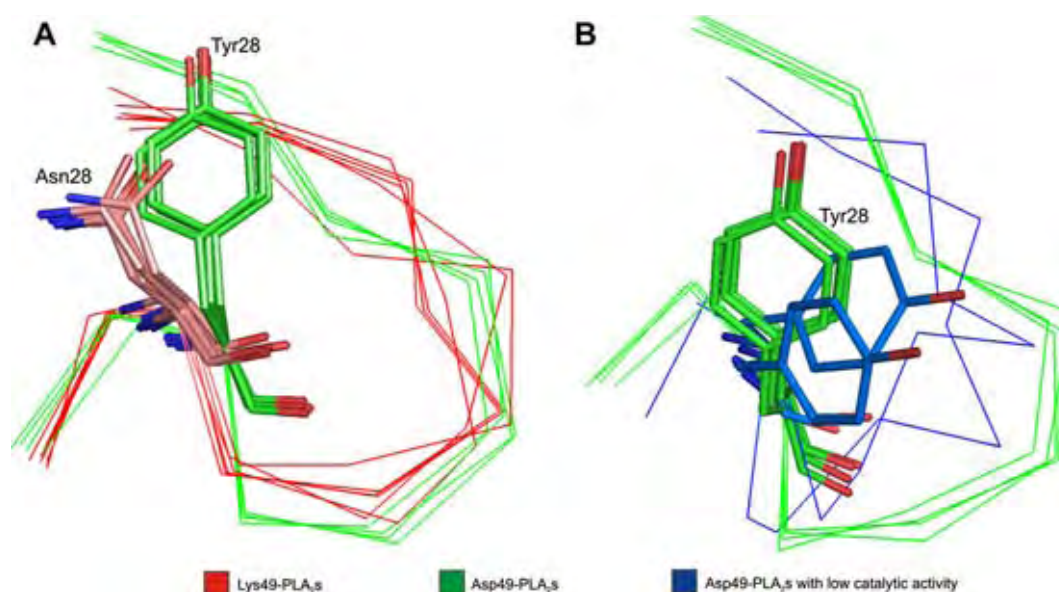


Fig. 9. Tyr28 (Asp49-PLA₂s) and Asn28 (Lys49-PLA₂s) side chain residues are shown in the Ca²⁺-binding loop region superposition of (A) Asp49-PLA₂s (green) and Lys49-PLA₂s (red) structures and (B) Asp49-PLA₂s (green) and low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s (blue) structures. The Asp49-PLA₂s (green) are represented by BthA-I-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID 1U73), Acid Phospholipase from *Gloydius halys* venom (PDB ID 1PSJ), DPLA₂ from *Daboia russelli pulchella* venom (PDB ID 1FB2) and β -2 Bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom (PDB ID 1BUN). The low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s (blue) are represented by BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID 2OQD) and PrTX-III from *Bothrops pirajai* venom (PDB ID 1GMZ). The Lys49-PLA₂s (red) are represented by apo-dBthTX-I from *Bothrops jararacussu* venom (this work, PDB ID 3HZD), apo-PrTX-I from *Bothrops pirajai* venom (PDB ID 2Q2J), BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* venom (PDB ID 1PA0), apo-BaspTX-II from *Bothrops asper* venom (PDB ID 1CLP), godMT-II from *Cerrophidion goodmani* venom (PDB ID 1GOD) and Anum-II from *Atropoides nummifer* venom (PDB ID 2AOZ). Drawn using “O” (Jones et al., 1991) and PyMOL (DeLano, 2002) programs.

4.3. What is the role of Lys122 in the Lys49-PLA₂s?

In the crystal structure of Piratoxin-II from *B. pirajai* (PrTX-II), the presence of additional electron density in the active site region led the authors to the hypothesis that a fatty acid molecule associated with a conserved water molecule remains bound to the protein following an interrupted catalytic cycle arrested at the final product release step (Lee et al., 2001). In this model, the N ϵ atom of the Lys49 neutralizes the formal negative charge of the transition state oxyanion, and the N ϵ of Lys122 serves as an auxiliary electrophile in substrate hydrolysis. Lys122 would hyperpolarize Cys29–Gly30 peptide by increasing its affinity for the fatty acid, thus trapping this enzymatic product at the active site (Lee et al., 2001). However, after the PrTX-II structure was solved, several other Lys49-PLA₂s structures, in apo and complexed forms, have been solved (dos Santos et al., 2009; Magro et al., 2003; Marchi-Salvador et al., 2009; Murakami et al., 2005, 2007; Watanabe et al., 2005), thus necessitating a review of the position of Lys122 in these new structures.

Table 4 summarizes different structural data of Lys122 for 30 different monomers for apo and complexed Lys49-PLA₂ whose coordinates are available in the PDB data bank. There are 12 monomers in which Lys122 interacts with the Cys29 versus 18 monomers where this interaction does not occur. However, the polarization of both monomers in the same structure occurs only for the complexes MjTX-II-stearic acid and PrTX-II-putative fatty acid. apo-Lys49-PLA₂s – including BnSP-6, BnSP-7, mBthTX-I, dBthTX-I, PrTX-I and BaspTX-II – present one or no Lys122–Cys29 interaction. Other complexes – including mBthTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/PEG4000, BthTX-I/ α T, PrTX-I/ α T, BaspTX-II/suramin and BthTX-I/PEG400 – also present one or no Lys122–Cys29 interaction. In some cases, Lys122 side chains lack electron density above 1.2 σ , probably due to their high flexibility, not interacting with Cys29 or any other residue. Table 4 also shows our analysis of the B-factors for Lys122 side chains. It

can be observed that only seven Lys122 residues present B-factor values compatible with the average of their respective proteins, while all others present very high values (in most cases the values are 50% higher). These results indicate the high flexibility of these residues in the majority of the structures which is not compatible with the polarization process previously proposed by Lee et al. (2001).

The analysis of these structures also revealed another interesting structural feature of Lys122. Besides Cys29, this residue can also interact with a carboxyl group from the other residues: Tyr25 in mBthTX-I/BPB; Gly26 in BnSP-6, apo-BaspTX-II and mBthTX-I/BPB; Cys27 in BaspTX-II/suramin, apo-mBthTX-I and apo-dBthTX-I; Leu32 and Gly33 in BnSP-7; and Arg34 in BaspTX-II/suramin. Therefore, Lys 122 is a very flexible residue that may adopt random configurations, interacting with different sites of negative charges (Fig 6). Similarly, for MjTX-II/stearic acid and PrTX-II, there would be no functional reason for the Lys122/Cys29 interaction, like for the other interactions formed by Lys122 in other Lys49-PLA₂s.

Interestingly, a crystal structure of myotoxic and catalytically inactive Ser49-PLA₂ from *Echis carinatus sochureki* presents an additional electron density in hydrophobic channel that was modeled as lauric acid (Zhou et al., 2008). However, in this class of PLA₂s, the interaction with fatty acid is independent of Lys122, since this residue is not conserved for Ser49-PLA₂ and there is not any residue capable of hyperpolarizing the Cys29–Gly30 peptide bond.

Then, we can hypothesize that the affinity of the hydrophobic channel by fatty acids are related to membrane anchorage rather than Lys49-PLA₂s catalytic inactivity, which may, eventually, be aided by hyperpolarization caused by Lys122. As proposed by dos Santos et al. (2009), this interaction causes a side-by-side alignment of the region responsible for myotoxic activity (C-terminus/myotoxic site), allowing the interaction with the membrane. In this hypothesis two functions may be associated

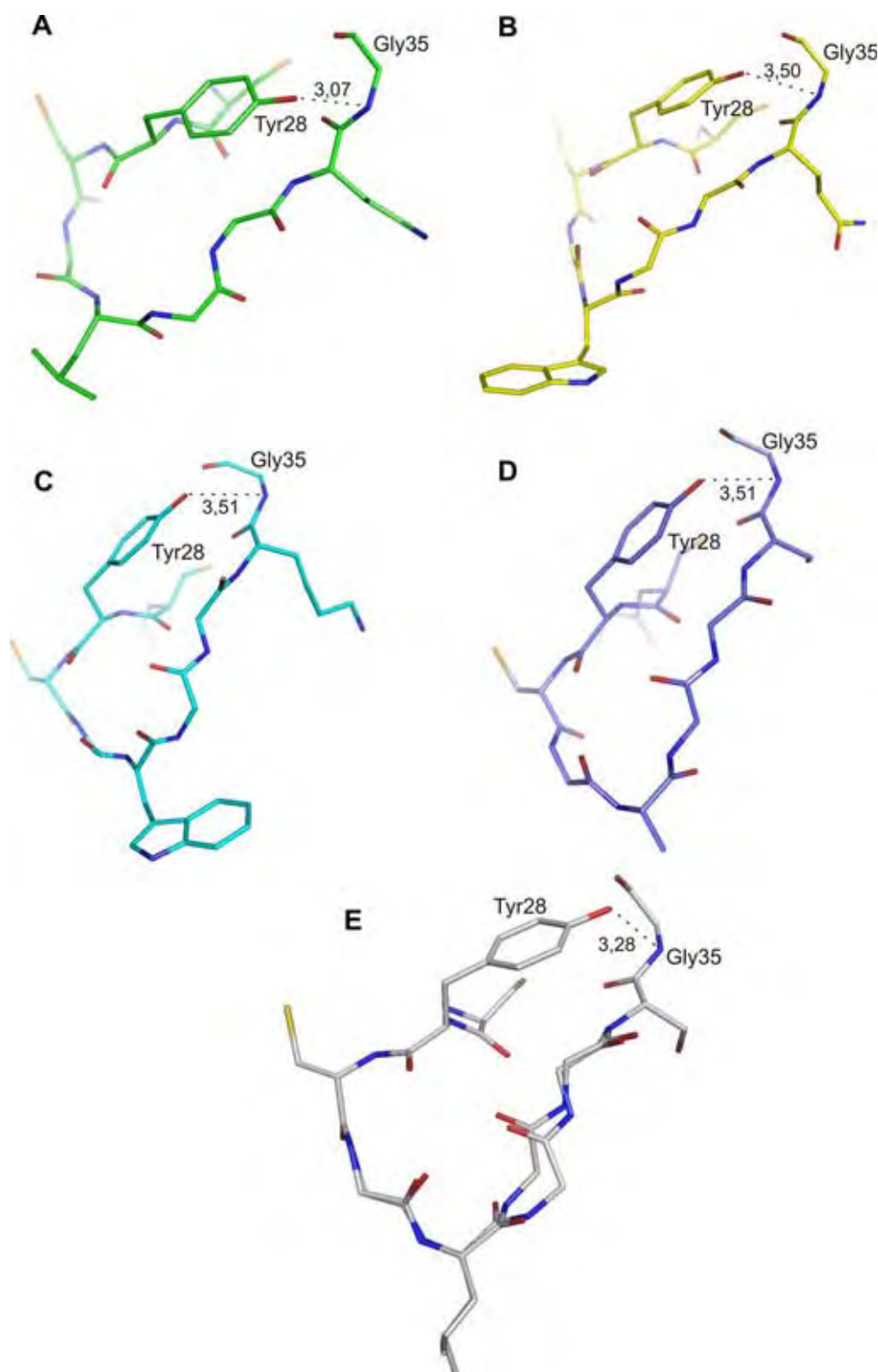


Fig. 10. Interaction between $O\gamma$ atom of Tyr28 residue and Gly35 amino group that stabilizes the Ca^{2+} -binding loop region of Asp49-PLA₂s structures. (A) BthA-I-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom (PDB ID 1U73). (B) Acid phospholipase from *Gloydius halys* venom (PDB ID 1PSJ). (C) DPLA₂ from *Daboia russelli pulchella* venom (PDB ID 1FB2). (D) β -2-Bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom (PDB ID 1BUN). (E) Phospholipase A₂ from *Bos taurus* pancreas (PDB ID 1G4I). Drawn using PyMOL program (DeLano, 2002).

with Lys122 residue: (i) to aid fatty acid anchorage in the hydrophobic channel by hyperpolarization of Cys29, (ii) direct action on the muscle membrane given that this residue is in the C-terminal region of Lys49-PLA₂s which is related to their myotoxic activity.

4.4. Ca^{2+} -binding loop and its role in the Lys49-PLA₂s catalytic inactivity

Lys49-PLA₂s are very intriguing proteins because they share high sequential identity with Asp49-PLA₂s but do not display cat-

Table 6

Values of d distance between C_{α} atoms of Tyr28 and Gly33 reflecting the aperture of Ca^{2+} -binding loop in Asp49-PLA₂s and Lys49-PLA₂s structures.

Class	Protein	d
Lys49-PLA ₂ s	apo-dBthTX-I	6.05
	PrTX-I	6.22
	BnSP-7	6.46
	Anum-II	6.30
	godMT-II	5.06
Asp49-PLA ₂ s	BthA-I-PLA ₂ s	4.20
	Acid-PLA ₂ s	4.41
	DPLA ₂	4.58
	β 2-Bungarotoxin	4.33
	PLA ₂ s pancreatic bovine	3.91

alytic activity. Furthermore, both Lys49-PLA₂s and Asp49-PLA₂s have a highly conserved catalytic network (His48, Tyr53 and Asp99) with the exception of Asp49 residue in Lys49-PLA₂s. Site-directed mutagenesis experiments with a Lys49-PLA₂ showed that Lys49Asp mutant remained catalytically inactive, demonstrating, in turn, that this single mutation is not crucial to the lack of enzymatic activity in these toxins (Ward et al., 2002), and suggesting that the catalytic inactivity of these homologue PLA₂s may be related to other structural features.

In order to understand the reasons for the catalytic inactivity of Lys49-PLA₂s, we performed a structural comparison of Ca^{2+} binding loop regions from Lys49-PLA₂s, Asp49-PLA₂s and low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s (BthTX-II and PrTX-III) which also display myotoxic activity as Lys49-PLA₂s (Correa et al., 2008).

Table 5 and Fig. 7 show the C_{α} superposition between the Ca^{2+} binding loop regions (residues 27–35) from several snake venom PLA₂s. This comparison reveals that this loop adopts a similar conformation within Lys49-PLA₂s and within Asp49-PLA₂s, but when these two classes are compared the conformation becomes very different. Additionally, the low-catalytic Asp49-PLA₂s present strongly distorted Ca^{2+} -binding loops when compared to Lys49-PLA₂s and other Asp49-PLA₂s, as previously described by Correa et al. (2008).

Amino acid sequence alignment of Ca^{2+} -binding loop region of Lys49-PLA₂s and Asp49-PLA₂s from several snakes, showed that Tyr28 is conserved for all Asp49-PLA₂s while Asn28 is conserved for Lys49-PLA₂s (Fig. 8). These are the only strictly conserved residues in the Ca^{2+} -binding loop regions in these proteins. Furthermore, the Tyr28 side chain is also structurally conserved in Asp49-PLA₂s, with the exception of low-catalytic Asp49-PLA₂s (Fig. 9).

The structural analysis of Tyr28 of Asp49-PLA₂s reveals an important stability feature of the Ca^{2+} -binding loop region. All Asp49-PLA₂s (except low-catalytic Asp49-PLA₂s) present a conserved interaction between O_{γ} atom of Tyr28 and Gly35 amino group in the range from 3.1 Å to 3.5 Å (Fig. 10) which is also present in other catalytic PLA₂s, including pancreatic bovine PLA₂ (Steiner et al., 2001). Recently, the lack of this interaction was pointed as responsible for Ca^{2+} -binding loop disarrangement in Ser49-PLA₂ Ecarpholin S from *Echis carinatus sochureki* venom (Zhou et al., 2008). This Tyr28–Gly35 interaction may provide more structural stability for the Ca^{2+} -binding loop which may be verified by the conservation of the distance d (Supplementary Fig. 2) that reflects the aperture of this loop. Table 6 shows that the distance d between C_{α} atoms of Tyr28 and Gly33 in Asp49-PLA₂s (except low-catalytic-activity Asp49-PLA₂s) is approximately 4.3 Å. In contrast, for Lys49-PLA₂s, due to the natural mutation Tyr28Asn, the distance d becomes greater than 6.3 Å. This open configuration of Ca^{2+} -binding loop may be one of the factors responsible for the inability of Ca^{2+} ion to bind to Lys49-PLA₂, even when the Lys49Asp mutation is performed by site-directed mutagenesis (Ward et al., 2002).

Despite the presence of Tyr28 in low-catalytic Asp49-PLA₂s, these toxins present a great distortion in the Ca^{2+} -binding loop region (Fig. 6 and Table 5). Fig. 9 shows that Tyr28 side chain in low-catalytic Asp49-PLA₂s does not have the same orientation as the Tyr28 side chains in other Asp49-PLA₂s probably due to the interaction of this residue with the Asp49 side chain (Correa et al., 2008). Consequently, the Tyr28–Gly35 interaction does not form, causing the disorder observed in the Ca^{2+} -binding loop region of these enzymes and, consequently, preventing the binding of Ca^{2+} ion.

5. Concluding remarks

Despite its catalytic inactivity, the hydrophobic channel of Lys49-PLA₂ is a very intriguing region due to its conservation of most of residues involved in catalytic activity and high affinity for long-chain hydrophobic molecules. On account of the latter characteristic, in this work, we reinforce the previous proposal of Marchi-Salvador et al. (2009) of the two different binding regions of Lys49-PLA₂s and membranes, the hydrophobic channel and the myotoxic site/C-terminal, where the hydrophobic channel would be the anchor for the myotoxic action of Lys49-PLA₂s.

Herein, the controversial role of Lys122 was analyzed in depth, in light of the 30 different known monomers for apo and complexed Lys49-PLA₂s structures. The data show that the N_{ϵ} of Lys122 probably binds to different carboxyl groups in order to stabilize the crystal structures and that its role may be associated with membrane binding rather than hyperpolarization of Cys29/Gly30. However, if this polarization really occurs, we believe that this interaction is related to membrane anchorage of Lys49-PLA₂s, rather than a role in its catalytic inactivity.

Finally, a structural comparison of Ca^{2+} binding loop regions from Lys49-PLA₂s and Asp49-PLA₂s reveals that the conservation of the residue Tyr28 in Asp49-PLA₂s is vital to the structural integrity of this region in these enzymes. This residue stabilizes the Ca^{2+} binding loop region by an interaction between its O_{γ} atom and the Gly35 amino group. In Lys49-PLA₂s that have an Asn residue instead of a Tyr residue in position 28, this interaction does not occur, which contributes to destabilizing the Ca^{2+} -binding loop region and preventing the binding of Ca^{2+} cofactor. In low-catalytic Asp49-PLA₂s, despite the presence of Tyr28, this interaction does not occur, due to its interaction with Asp49 residue which also prevents the binding of Ca^{2+} ion.

The hypotheses raised in this work may be useful for guiding new biophysical and biochemical experiments that may definitively clarify the action mechanism of intriguing snake venom PLA₂s and lead to the design of structure-based inhibitors to complement the serum therapy, thus preventing the permanent injuries still caused by these proteins in snakebite victims around the world.

6. Atomic coordinates

The coordinates were deposited in the Protein Data Bank with identification codes 3HZD, 3HZW, 3IO3, 3IQ3, 3I3I.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS, Campinas-SP).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jsb.2010.03.019.

References

- Angulo, Y., Gutierrez, J.M., Soares, A.M., Cho, W., Lomonte, B., 2005. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. *Toxicon* 46, 291–296.
- Arni, R.K., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Tulinsky, A., 1995. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 51, 311–317.
- Arni, R.K., Fontes, M.R.M., Barberato, C., Gutierrez, J.M., Diaz, C., Ward, R.J., 1999. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Arch. Biochem. Biophys.* 366, 177–182.
- de Azevedo, W.F., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Arni, R.K., 1999. Structure of a Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). *Toxicon* 37, 371–384.
- Brunker, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D – Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- Chandra, V., Kaur, P., Jasti, J., Betzel, C., Singh, T.P., 2001. Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* (DPLA2) at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 1793–1798.
- Chioato, L., Aragao, E.A., Ferreira, T.L., de Medeiros, A.I., Faccioli, L.H., Ward, R.J., 2007. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1768, 1247–1257.
- Correa, L.C., Marchi-Salvador, D.P., Cintra, A.C.O., Sampaio, S.V., Soares, A.A., Fontes, M.R.M., 2008. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics* 1784, 591–599.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA.
- Diaz-Oreiro, C., Gutierrez, J.M., 1997. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35, 241–252.
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrichson, R.L., Watenpaugh, K.D., 1990. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 265, 17649–17656.
- Homsí-Brandeburgo, M.L., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothroptoxin. *Toxicon* 26, 615–627.
- Jancarik, J., Kim, S.H., 1991. Sparse-matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409–411.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M., 1991. Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* 47, 110–119.
- Krisinel, E., Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797.
- Kwong, P.D., McDonald, N.Q., Sigler, P.B., Hendrickson, W.A., 1995. Structure of beta 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. *Structure* 3, 1109–1119.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Procheck – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lee, W.H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., Garratt, R.C., 2001. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂ – a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry* 40, 28–36.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall 3rd, W.B., de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2003. Structure validation by Alpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50, 437–450.
- Magro, A.J., Soares, A.M., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M., 2003. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 713–720.
- Magro, A.J., Takeda, A.A., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., 2005. Structure of BthA-I complexed with *p*-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, 1670–1677.
- Magro, A.J., Fernandes, C.A., dos Santos, J.I., Fontes, M.R., 2009. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. *Protein Pept. Lett.* 16, 852–859.
- Marchi-Salvador, D.P., Fernandes, C.A., Silveira, L.B., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2009. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with *p*-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1583–1590.
- McPherson, A., 2003. Introduction to Macromolecular Crystallography, Wiley-Liss, Hoboken.
- Moolenaar, W.H., van Meeteren, L.A., Giepmans, B.N., 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26, 870–881.
- Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martinez, A.B., Calil-Elias, S., Tomaz, M.A., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Arni, R.K., 2005. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin. *J. Mol. Biol.* 350, 416–426.
- Murakami, M.T., Vicoti, M.M., Abrego, J.R.B., Lourenzoni, M.R., Cintra, A.C.O., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Melo, P.A., Arni, R.K., 2007. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. *Toxicon* 49, 378–387.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
- Navaza, J., 1994. Amore – an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* 50, 157–163.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromol. Crystallogr. Pt A* 276, 307–326.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 419–445.
- Rogers, J., Yu, B.Z., Serves, S.V., Tsigoulis, G.M., Sotiropoulos, D.N., Ioannou, P.V., Jain, M.K., 1996. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A₂. *Biochemistry* 35, 9375–9384.
- dos Santos, J.I., Soares, A.M., Fontes, M.R.M., 2009. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. *J. Struct. Biol.* 167, 106–116.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246–1259.
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250, 1541–1546.
- Scott, D.L., Achari, A., Vidal, J.C., Sigler, P.B., 1992. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* 267, 22645–22657.
- da Silva Giotto, M.T., Garratt, R.C., Oliya, G., Mascarenhas, Y.P., Giglio, J.R., Cintra, A.C.O., de Azevedo, W.F., Arni, R.K., Ward, R.J., 1998. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothroptoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Proteins–Struct. Funct. Bioinform.* 30, 442–454.
- Soares, A.M., Guerra-Sa, R., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni, L., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 201–209.
- Steiner, R.A., Rozeboom, H.K., de Vries, A., Kalk, K.H., Murshudov, G.N., Wilson, K.S., Dijkstra, B.W., 2001. X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at atomic resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 516–526.
- Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., 2002. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 535–556.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A., Thornton, J.M., 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein–ligand interactions. *Protein Eng.* 8, 127–134.
- Wang, X.Q., Yang, J., Gui, L.L., Lin, Z.J., Chen, Y.C., Zhou, Y.C., 1996. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 255, 669–676.
- Ward, R.J., Chioato, L., de Oliveira, A.H.C., Ruller, R., Sa, J.M., 2002. Active-site mutagenesis of a Lys(49)-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem. J.* 362, 89–96.
- Watanabe, L., Soares, A.M., Ward, R.J., Fontes, M.R.M., Arni, R.K., 2005. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. *Biochimie* 87, 161–167.
- Yu, B.Z., Berg, O.G., Jain, M.K., 1993. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A₂. *Biochemistry* 32, 6485–6492.
- Yu, B.Z., Rogers, J., Nicol, G.R., Theopold, K.H., Seshadri, K., Vishweshwara, S., Jain, M.K., 1998. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as K_s and K_{cat} cofactors for secreted phospholipase A₂. *Biochemistry* 37, 12576–12587.
- Zhou, X., Tan, T.C., Valiyaveetil, S., Go, M.L., Kini, R.M., Velazquez-Campoy, A., Sivaraman, J., 2008. Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. *Biophys. J.* 95, 3366–3380.