UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Instituto de Química Departamento de Físico-Química Programa de Pós-Graduação em Química

Estudos Estruturais de Fosfolipases de Venenos de Serpentes e Aldose Redutases de Milho por Cristalografia e SAXS

Marcelo Leite dos Santos Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aparicio

Campinas, 09 de março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Sa59e	Santos, Marcelo Leite dos. Estudos estruturais de fosfolipases de venenos de serpentes e aldose redutases de milho por cristalografia e SAXS / Marcelo Leite dos Santos Campinas, SP: [s.n], 2010.
	Orientador: Ricardo Aparicio.
	Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Fosfolipases A2. 2. Aldose redutases. 3. SAXS. Cristalografia de proteínas. I. Aparicio, Ricardo. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Structural studies of phospholipases from snake venoms and aldose reductases from maize by crystallography and SAXS

Palavras-chaves em inglês: Phospholipase A2, Aldose reductases, Protein crystallography, SAXS

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Ricardo Aparicio (orientador), Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ-UNICAMP), Munir Salomão Skaf (IQ-UNICAMP), Richard Charles Garrat (IFSC-USP-São Carlos), Sérgio Teixeira Ferreira (IBM/CCS-UFRJ)

Data de defesa: 09/03/2010

Para minha amada esposa, Jacqueline, a quem devo e dedico esta tese

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pelo dom da vida;
- À minha esposa, Jacque, pela companhia e porto seguro nos momentos difíceis;
- Aos meus pais, Zé Bispo e Magna; sogro e sogra, Veríssimo e Genilde, pelo apoio em todos os momentos;
- Aos meus irmãos, Márcio e Márcia; cunhados, Vinicius, Thiago e Mônica, e sobrinhos, Raphael, Caio e Lorena, por completarem minha família;
- À minha avó Nina (*in memorian*), pelo exemplo de trabalho e vontade de viver;
- Aos meus grandes amigos Dudu e Aline, pela ajuda e amizade desde o ínício de minha jornada em Campinas;
- Aos amigos de cada dia, especialmente, Fábio, Luiz, Reis, Elaine, Elias, Rafael, Mathias e outros que esqueci no momento, mas que guardo no coração, pelos ótimos momentos juntos;
- Aos pesquisadores Andrés Yunes e Sylvia de Sousa, professores Marcos Toyama, Otávio Thiemann, Marcelo Menossi e Anete Pereira, juntamente com seus alunos, pelas colaborações que permitiram a realização de grande parte desta tese;
- Ao professor Garib Murshudov, pelos ensinamentos e oportunidade do estágio no York Structural Biology Laboratory (YSBL);
- Aos amigos Eleanor e Guy Dodson, por terem praticamente me adotado durante minha estada em York;

- Aos demais colegas do YSBL, pela ajuda e receptividade durante meu estágio;
- Aos funcionários do Instituto de Química, CECOM e SOBRAPAR, por terem ajudado a garantir o bom andamento de meus trabalhos e minha saúde;
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pela utilização de linhas de luz dedicadas à Cristalografia de Macromoléculas e Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos, necessárias para realização de grande parte desta tese;
- Ao CNPq e CAPES, pelas bolsas de estudo concedidas no Brasil e no exterior;
- À Secretaria Estadual de Educação do Estado de Sergipe (SEED/SE), por minha liberação para estudos;
- Finalmente agradeço ao meu orientador, Ricardo Aparicio, pelo apoio e suporte nesses quatro anos de convívio.

CURRICULUM

Dados Pessoais :

Marcelo Leite dos Santos (Santos, M.L.) Natural de Itabaiana, Sergipe (22/03/1981) mleitesantos@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação :

2004 - Química Licenciatura, Universidade Federal de Sergipe (UFS).

2006 - Mestrado em Química, Universidade Federal de Sergipe (UFS). Estudos Teóricos da Atividade e Seletividade de Drogas Inibidoras da Enzima Dihidrofolato Redutase.

Em andamento - Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Estudos Estruturais de Fosfolipases de Venenos de Serpentes e Aldose Redutases de Milho por Cristalografia e SAXS.

Formação Complementar :

03/2008 a 07/2008 - Estágio de Capacitação Docente (PED C), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

05/2009 a 09/2009 - Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE CA-PES), *York Structural Biology Laboratory* (YSBL) - *The University of York*.

Atuação Profissional :

2004 a 2006 - Magistério no Ensino Médio (Servidor Público), Professor de Química. Colégio Estadual Murilo Braga (CEMB).

2004 a 2006 - Magistério no Ensino Superior (Contrato Temporário), Professor Substituto. Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Artigos Publicados :

2005 - Mesquita M.E., Barreto L.S., <u>Santos M.L.</u>, Freire R.O. Synthesis, modeling of the structure and kinetic study of the thermal decomposition of La(III) and Nd(III) complexes with 3-hydroxypicolinic acid. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.351, p.394-400.

2005 - Oliveira H.C.C., <u>Santos M.L.</u>, Barreto L.S., Santos M.A.C. Luminescência de vidros acetatos dopados com EuOCI. *Scientia Plena*. v.1, p.34-37.

2006 - Beltrão M.A., <u>Santos M.L.</u>, Mesquita M.E., Barreto L.S., Costa Jr N.B., Freire R.O., Santos M.A.C. Spectroscopic properties of the Eu(fod)3Phen-NO incorporated carboxylate glass. *Journal of Luminescence*. v.116, p.132-138.

2007 - Santos S.F., <u>Santos M.L.</u>, Almeida L.E., Costa Jr N.B., Gimenez I.F., Araki K., Mayer I., Engelmann F.M., Toma H.E., Barreto L.S. Fluorescent tetraruthenated porphyrins embedded in monolithic SiO2 gels by the sol-gel process. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.305, p.264-269.

2007 - Kiyota E., Sousa S.M., <u>dos Santos M.L.</u>, Lima A.C., Menossi M., Yunes J.A., Aparicio R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of maize aldose reductase. *Acta Crystallographica. Series F.* v.63, p.990-992.

2008 - dos Santos M.L., Fagundes F.H.R., Teixeira B.R.F., Toyama M.H., Aparicio R. Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from *B. Jararacussu. International Journal of Molecular Sciences.* v.9, p.736-750.

Artigos em Preparação :

<u>Santos M.L.</u>, Toyama D.O., Oliveira S.C.B., Fagundes F.H.R., Diz-Filho E.B., Iglesias C.V., Aparicio R., Toyama M.H. Título Provisório: Effects of naringin on the structure and pharmacological activities of the neurotoxic sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella*.

<u>Santos M.L.</u>, Fagundes F.H.R., Toyama M.H., Aparicio R. Título Provisório: Crystallography and bioinformatics in the study of platelet aggregation and the enzymatic and myotoxic activities of BjVIII: a new PLA2 Bthtx-I-like isoform.

<u>Santos M.L. & Sousa S.M.</u>, Kiyota E., Yunes J.A., Murshudov G.N., Koch K. & Aparicio R. Título Provisório: Biochemical and Structural Characterization of a New Aldose Reductase from Maize Embryo.

Soares J.S.M., <u>Santos M.L.</u>, Lima A.C., Kiyota E., Aparicio R., Menossi M. Título Provisório: Initial characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase from sugarcane by Small Angle X-ray Scattering (SAXS).

Resumo

Nesta tese são apresentados os resultados da caracterização estrutural, principalmente por Cristalografia e Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS), de importantes proteínas de venenos de serpentes e de semente de milho. Modelos estruturais foram obtidos para diferentes fosfolipases A2 (PLA2) de venenos, destacando-se dois modelos cristalográficos para uma PLA2 de Bothrops jararacussu resolvidos nos grupos de espaço P_{3_121} e $P_{2_12_12_1}$, numa resolução máxima de 1,83 Å e 1,98 Å, cujos valores finais de R_{factor} iguais a 19,7 % e 17,3 % (R_{free} = 26,5 % e 23,8 %) foram obtidos, respectivamente. Ambos modelos apresentaram um inesperado fator de agregação plaquetária em seu sítio ativo e um interessante padrão pentagonal de moléculas de água altamente organizadas na superfície externa do canal hidrofóbico. Também foram recuperados envelopes de SAXS para uma PLA2 de Crotalus durissus cascavella, antes e após seu tratamento com naringina, que apresentaram uma nova configuração dimérica para fosfolipases A2 em solução e permitiram identificar o provável sítio de interação deste flavonóide. As proteínas de semente estudadas são aldose redutases (AR), as quais parecem estar envolvidas no metabolismo de sorbitol no milho. Esta mesma enzima em humanos está diretamente relacionada com complicações diabéticas em situações de hiperglicemia ao catalisar a conversão da glicose em excesso a sorbitol, que por sua vez é extremamente tóxico às células. Ao todo, seis modelos cristalográficos (apoenzima, complexos com cofatores enzimáticos e complexos ternários) foram obtidos para ARs específicas do embrião e endosperma. Dois destes modelos tiveram seu refinamento estrutural finalizado. O primeiro, para a apoenzima AKR4C7 do endosperma, apresentou valores finais de R_{factor} e R_{free} iguais a 16,6 % e 20,0 % a uma resolução máxima de 1,45 Å. O segundo, para o complexo da AKR4C13 do embrião com o cofator enzimático NADPH, convergiu para valores de R_{factor} e R_{free} iguais a 15,4 % e 18,9 % também a uma resolução máxima de 1,45 Å. Análises preliminares dos modelos cristalográficos das ARs de milho foram realizadas com intuito de investigar as possíveis razões para a existência de atividade catalítica frente ao sorbitol, mas não para glicose. De modo geral, as principais características estruturais destas e de ARs de outros organismos são conservadas, incluindo os resíduos do sítio ativo e suas conformações. Assim, mais estudos ainda são necessários até que se possa compreender as razões para a predileção ao sorbitol, em detrimento da glicose, pelas ARs da semente de milho.

Abstract

This PhD thesis presents the results of a structural characterization of important proteins from snake venoms and maize seed mainly through Crystallography and Small-Angle X Ray Scattering (SAXS). Structural models were obtained for different phospholipases A2 (PLA2) from snake venoms, remarkably two crystallographic models for a PLA2 from Bothrops jararacussu in whose active site it was found an unexpected platelet aggregation factor and an interesting pattern of water clusters showing a highly organized pentagonal distribution that was found on the outside of the models' hydrophobic channel. Refined crystal structures were obtained at 1.98 Å and 1.83 Å resolution for crystals belonging to the space groups $P2_12_12_1$ and $P3_121$, showing crystallographic (R_{factor}) and R_{free} values of 17.3 % and 23.8 % for the space group $P2_12_12_1$ and 19.7 % and 26.5 % for the space group P3₁21. SAXS envelopes for a PLA2 from Crotalus durissus cascavella treated and non-treated with naringin which allowed to identify possible flavonoid binding sites were also recovered. In addition, it was observed that C. d. cascavella dimers present a new extended configuration never seen before for phospholipases A2 in solution. The seed proteins studied are aldose reductases (AR) that seems to be related with sorbitol metabolism in maize. In humans, aldose reductases are straightly related with diabetic complications in hyperglycemic situations where the conversion of excess glucose to sorbitol induces serious cellular damage, since this product is extremely toxic to cells. Altogether, six crystallographic models for apoenzyme, complexes with enzymatic cofactors and ternary complexes were obtained for specific ARs from embryo and endosperm. The structural refinement for two of these models was already finished.

The first model was obtained for the apoenzyme AKR4C7 from maize endosperm that presented R_{factor} and R_{free} values of 16,6 % and 20,0 %, respectively, at a maximum resolution of 1,45 Å. The second corresponds to the AKR4C13 from maize embryo complexed with the enzymatic cofactor NADPH for which crystallographic R_{factor} of 15,4 % and R_{free} of 18,9 %, at a maximum resolution of 1,45 Å, were obtained. Maize AR models were analyzed aiming at evaluate possible reasons for the lack of catalytic activity for glucose. In general, the main structural features of these ARs and from other organisms are conserved, including the active site residues and their conformations. Thereby, additional studies are still necessary to understand the reasons for the sorbitol preference over glucose in the enzimatic activity of maize aldose reductases.

Índice

Li	ista de Tabelas				
Li	sta d	e Figur	as	xxi	
1	Intro	odução			
	1.1	Estrutura e função proteica			
	1.2	Objeti	vos	6	
		1.2.1	Objetivo geral	6	
		1.2.2	Objetivos específicos	6	
2	Met	odolog	jia	7	
	2.1	1 Obtenção das proteínas estudadas		7	
	2.2	Caracterização espectroscópica		8	
		2.2.1	Dicroísmo Circular	8	
		2.2.2	Espectroscopia UV/VIS	10	
	2.3	B Espalhamento de Raios X (SAXS)		10	
	2.4	Cristalografia: parte experimental		16	
		2.4.1	Cristalização	16	
		2.4.2	Difração de Raios X	20	
	2.5	Cristalografia: parte computacional		23	
		2.5.1	Redução de dados	24	
		2.5.2	O problema das fases	26	
		2.5.3	Refinamento e validação dos modelos	28	

ÍNDICE

		2.5.4	Softwares utilizados	30
3	Fos	folipas	es A2 de venenos de serpentes Brasileiras	31
	3.1	PLA2	de Crotalus durissus cascavella	32
		3.1.1	Tratamento com flavonóides e alteração nas propriedades	
			farmacológicas	33
		3.1.2	Objetivos específicos	35
		3.1.3	Caracterização estrutural em solução	36
		3.1.4	Conclusões parciais	47
	3.2	PLA2	de Bothrops jararacussu	48
		3.2.1	Agregação plaquetária atípica	49
		3.2.2	Objetivos específicos	50
		3.2.3	Modelos cristalográficos	51
		3.2.4	Fator de agregação plaquetária inesperado no sítio ativo .	56
		3.2.5	Conclusões parciais	66
	3.3	PLA2	de Crotalus durissus terrificus	66
		3.3.1	Objetivos específicos	67
		3.3.2	Caracterização cristalográfica preliminar	67
		3.3.3	Conclusões parciais	74
4	Ald	ose Re	dutases de semente de milho	75
	4.1	Metab	oolismo de sorbitol e detoxificação	77
	4.2	AR do	endosperma	78
		4.2.1	Objetivos específicos	79
		4.2.2	Modelos estruturais	80
		4.2.3	Análises preliminares dos modelos	94
		4.2.4	Conclusões parciais	97
	4.3	AR do	embrião	98
		4.3.1	Objetivos específicos	98
		4.3.2	Caracterização cristalográfica e espectroscópica	99
		4.3.3	Sítio ativo de ARs de plantas	111
		4.3.4	Conclusões parciais	113

ÍNDICE

5	Trabalhos adicionais		
	5.1	Proteínas de cana-de-açúcar	115
	5.2	Proteínas da bactéria Xylella fastidiosa	118
6	Con	clusões e perspectivas futuras	121
Α	Artigos publicados e em fase final de preparação		
	A.1	Artigos publicados	125
	A.2	Artigos em fase final de preparação	144
B Atividades acadêmicas, cursos e eventos científicos		idades acadêmicas, cursos e eventos científicos	161
	B.1	Atividades acadêmicas	161
	B.2	Cursos e eventos científicos	162
Re	Referências Bibliográficas 165		

Lista de Tabelas

3.1	Estatísticas dos processamentos dos dados de difração da BjVIII.	55
3.2	Parâmetros do cristal de F17 e estatísticas dos processamentos	73
4.1	Estatísticas dos processamentos dos dados da AKR4C7	85
4.2	Parâmetros dos cristais e estatísticas dos processamentos dos da-	
	dos para os complexos da enzima AKR4C7	91
4.3	Estatísticas da coleta de dados de difração de Raios X e refina-	
	mento estrutural do complexo AKR4C13+NADPH	102
4.4	Principais resultados da predição dos elementos de estrutura se-	
	cundária da AKR4C13.	105

Lista de Figuras

2.1	Função de distribuição de distâncias teórica para diferentes corpos	
	geométricos	12
2.2	Ilustração da forma típica do Kratky plot	13
2.3	Ilustração do método de cristalização da gota suspensa	18
3.1	Fórmulas estruturais dos flavonóides estudados.	34
3.2	Espectros de CD obtidos para a fosfolipase A2 de Crotalus	
	durissus cascavella.	37
3.3	Dados de SAXS para a proteína PLA2 de <i>C. d. cascavella</i>	39
3.4	Representação em cartoon do modelo de homologia da PLA2 de	
	C. d. cascavella.	44
3.5	Modelos de SAXS para a fosfolipase A2 de Crotalus durissus	
	cascavella.	45
3.6	Cristais típicos da proteína BjVIII	52
3.7	Imagens de difração dos cristais de BjVIII	53
3.8	Moléculas de água pentagonalmente arranjadas.	57
3.9	Representação em estéreo dos mapas de densidade eletrônica do	
	sítio ativo da BjVIII	58
3.10	Conteúdos das ASUs dos modelos cristalográficos obtidos para a	
	proteína BjVIII.	60
3.11	Superposição estrutural dos modelos cristalográficos da BjVIII	61

LISTA DE FIGURAS

3.12	Representação do empacotamento cristalino da BjVIII no grupo de	00
	espaço $P3_121$.	63
3.13	Diagrama esquemático do sítio ativo da BjVIII.	65
3.14	Cristal típico de F17	68
3.15	Padrão de difração da proteína F17	69
3.16	Representação gráfica das funções de auto-rotação calculadas	
	para a F17	71
4.1	Representação esquemática de uma semente de milho	76
4.2	Cristais típicos de AR que cresceram em forma de placas.	81
4.3	Imagens de difração do cristal de AKR4C7	82
4.4	Representação em <i>cartoon</i> do motivo $(\alpha/\beta)_8$ -barril característico	
	da superfamília AKR	84
4.5	Melhores resultados dos ensaios de co-cristalização para a AKR4C7.	87
4.6	Cristais obtidos para os complexos ternários da AKR4C7	89
4.7	Conteúdos das ASUs para os modelos cristalográficos dos com-	
	plexos da enzima AKR4C7.	92
4.8	Representação da tétrade catalítica dos modelos da AKR4C7 e AR	
	humana	95
4.9	Monocristal obtido para o complexo da AKR4C13+NADPH	100
4.10	Modelo cristalográfico para o complexo AKR4C13+NADPH	101
4.11	Espectros de CD para a proteína AKR4C13.	104
4.12	Curvas de desnaturação térmica para a proteína AKR4C13	106
4.13	Mapa de densidade eletrônica correspondente ao NADPH obser-	
	vado no sítio ativo da proteína AKR4C13.	108
4.14	Esquema de reações que usam cofatores enzimáticos.	109
4.15	Experimentos de cinética para a reação entre o ácido succínico e	
	o NADPH	110
4.16	Representação em estéreo do sítio ativo das diferentes ARs de	
	plantas	112

Capítulo 1

Introdução

1.1 – Estrutura e função proteica

Por que estudar a estrutura de proteínas? Esta é sem dúvida a pergunta mais importante a ser respondida ao iniciar, desenvolver ou avaliar um trabalho de caracterização estrutural destas importantes, e ao mesmo tempo complexas, macromoléculas. Talvez a melhor resposta a esta questão é que proteínas suportam aspectos importantes da atividade dos sistemas biológicos e, conhecendo o arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos, e não somente o tamanho e composição (tipo e sequência) da cadeia polipeptídica, pode-se sugerir possíveis mecanismos de funcionamento molecular destas intrigantes biomoléculas. Em outras palavras, é importante conhecer a estrutura de proteínas e complexos proteicos, em termos de modelos, porque ela está diretamente relacionada com sua função, e esta função determina seu interesse científico e econômico em diversas aplicações: desde o entendimento de vias bioquímicas dos sistemas biológicos a aplicações na indústria de alimentos, agricultura e, principalmente, em medicina, por exemplo no estudo de doenças como a fibrose cística, câncer e AIDS.

Foi há mais de 100 anos que o guímico alemão Eduard Büchner revolucionou a visão da função proteica, ao demonstrar que extratos de levedura na ausência de células vivas favoreciam a fermentação de açúcares em etanol e dióxido de carbono, tendo sido laureado com o Nobel de Química em 1907 por seus trabalhos. Suas experiências revelaram que a fermentação alcoólica se deve a ação de enzimas (denominadas por ele zimase) e não devido à simples ação fisiológica das células de levedura. 65 anos depois, Christian Anfinsen foi premiado com o Nobel de Química por seus estudos com ribonucleases, sugerindo a relação entre a sequência de aminoácidos e configuração proteica biologicamente ativa (dogma de Anfisen). Seu trabalho demonstrou que estas proteínas poderiam ser re-enoveladas após sua desnaturação preservando sua atividade enzimática sugerindo, assim, que toda informação necessária para o enovelamento proteico e conseguente atividade está codificada na seguência de aminoácidos (estrutura primária). É a estrutura primária que define os possíveis arranjos para estes resíduos de aminoácidos através de impedimentos estéricos e interações estabelecidas: eletrostáticas, Van der Waals e ligações de hidrogênio. Atualmente, sabe-se que algumas proteínas necessitam da assistência de outras, chamadas chaperonas, para alcançar seu correto enovelamento.

A depender do padrão das interações entre os resíduos de aminoácidos, principalmente ligações de hidrogênio, são formados diferentes elementos de estrutura secundária: hélices- α (α -helix), folhas- β (β -sheet), voltas (*turns*) e regiões randômicas (*coils* ou *loops*). Esses elementos de estrutura secundária se reconhecem tridimensionalmente e interagem formando a chamada estrutura terciária. Por fim, além do correto enovelamento, para funcionar, uma proteína pode atuar como oligômero ou ainda requerer um cofator enzimático (estrutura quaternária).

Mas, como determinar a estrutura tridimensional de uma proteína ou

complexo proteico que podem auxiliar no entendimento da função biológica? A Cristalografia por difração de Raios X é, sem dúvida, o principal método empregado na determinação da estrutura de proteínas de interesse, abrangendo cerca de 87 % das estruturas protéicas depositadas no Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), determinadas através desta técnica até janeiro de 2010. Porém, cada vez mais, a Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Microscopia Eletrônica Criogênica (Cryo-Electron Microscopy, Cryo-EM) e o Espalhamento de Raios X a Baixos Angulos (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS) têm se tornado populares para esse propósito, salvo as limitações inerentes de cada método, incluindo aquelas da Cristalografia. É importante mencionar ainda que outras técnicas como Espectroscopias no Infravermelho, Ultravioleta/Visível (UV/VIS) e Raman, por Dicroísmo Circular (Circular Dichroism, CD), Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico, por Fluorescência, Espectrometria de Massa e técnicas calorimétricas como Calorimetria de Titulação Isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) e Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry, DSC), fornecem informações complementares, em muitos casos vitais, para o correto entendimento dos dados estruturais e funcionais dos sistemas em estudo.

Além das técnicas experimentais, o impressionante desenvolvimento dos métodos computacionais de análise e comparação de proteínas em todos os níveis de estruturas tem permitido, cada vez mais, extrair informações e avaliar gigantescos conjuntos de dados que, sem utilização dos mesmos, continuariam muitas vezes inacessíveis. Modelos estruturais de proteínas são tridimensionais e sua representação bidimensional limita, muitas vezes, a compreensão destes sistemas; disso decorre a importância da utilização de computadores e programas de visualização gráfica para melhor entendimento dos arranjos de aminoácidos, sua distribuição

espacial e interações inter- e intramoleculares.

O atual estágio de desenvolvimento dos métodos de determinação de modelos proteicos estruturais é consequência de uma série de avanços nas áreas de Biologia Estrutural, Engenharia Genética e Biologia Molecular, que teve como seu marco inicial a elucidação da estrutura em dupla hélice do DNA, em 1953 por James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin e Maurice Wilkins e que rendeu a Watson e Crick o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1962. No mesmo ano, Max Perutz e John Kendrew foram laureados com o Nobel de Química por decifrar as primeiras estruturas proteicas, hemoglobina e mioglobina, respectivamente. Alguns anos depois, em 1969, a cientista Dorothy Hodgkin descreveu a estrutura tridimensional da insulina, mas foi em 1964 que Dorothy recebeu o prêmio Nobel de Química pela descoberta da estrutura da vitamina B12. Em 1988, Johann Deisenhofer, Robert Huber e Hartmut Michel foram agraciados com o prêmio Nobel de Química por desvendar a estrutura tridimensional do centro de reação fotossintético, um complexo de proteínas e cofatores ligados à membrana de certas bactérias que realizam fotossíntese. No ano seguinte, o primeiro gene humano, o gene relacionado com a doença hereditária fibrose cística, foi sequenciado pelo grupo de Francis Collins e Lap-Chee Tsui e a primeira estrutura de uma proteína relacionada à AIDS, a HIV-1 protease, foi determinada.

Um dos maiores avanços tecnológicos, que permitiu a produção de proteínas de interesse em larga escala e o consequente aumento no número de proteínas caracterizadas estruturalmente, foi premiado em 1993 com o prêmio Nobel de Química concedido a Kary Mullis por desenvolver, em 1983, a reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), técnica utilizada na amplificação de DNA. Uma outra importante premiação do Nobel de Química foi concedida, em 2002, a John Fenn e Koichi Tanaka e também a Kurt Wüthrich, pelo desenvolvimento

da Espectrometria de Massas e da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, respectivamente, ambas aplicadas na determinação da estrutura tridimensional de moléculas biológicas em solução. No ano seguinte, novos estudos de determinação estrutural de proteínas por Cristalografia foram agraciados com o Nobel de Química, Peter Agre e Roderick Mackinnon foram premiados pela descoberta de canais celulares para a condução de moléculas de água e de íons, respectivamente. Finalmente, pesquisas com ribossomos a nível atômico renderam o Nobel de Química de 2009 a Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz e Ada Yonath.

Apesar das inúmeras premiações e do considerável estágio de desenvolvimento da chamada Biologia Estrutural, ainda são muitos os problemas científicos e desafios tecnológicos atuais, principalmente no estudo de questões de interesse regional e de relevância econômica local, como é o caso de doenças tropicais e de lavouras de cana-de-açúcar, laranja e milho. Os trabalhos desta tese de doutorado englobam problemas de interesse nacional e sistemas biológicos tipicamente brasileiros ou adaptados aos nossos ecossistemas. Os resultados desta tese serão oportunamente publicados, incluindo os modelos estruturais obtidos e devidamente validados, de modo a garantir o acesso e utilização dos mesmos nacional- e internacionalmente.

Uma descrição mais detalhada dos diferentes aspectos que relacionam a estrutura de proteínas com suas funções, incluindo diversos exemplos e a descrição de importantes técnicas empregadas na caracterização estrutural e funcional destes sistemas, é apresentada no livro *Proteins: structure and function* de David Whitford [1].

1.2 – Objetivos

1.2.1 – Objetivo geral

Os trabalhos desta tese de doutorado visam a obtenção de modelos estruturais para diferentes proteínas purificadas de venenos de serpentes da fauna Brasileira e outras recombinantes de semente de milho, principalmente através das técnicas de Cristalografia, no caso de cristalização das proteínas de interesse, e Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos, nas análises em solução, de modo a investigar questões biológicas e funcionais dos sistemas em estudo.

1.2.2 – Objetivos específicos

Para uma maior clareza e organização os objetivos específicos relativos aos diversos projetos desenvolvidos são apresentados separadamente para cada proteína estudada nas diferentes seções desta tese.

Capítulo 2

Metodologia

2.1 – Obtenção das proteínas estudadas

As proteínas estudadas nesta tese foram obtidas através de diferentes colaborações e, em geral, estes alvos foram definidos em conjunto com nossos colaboradores, sendo que atuamos principalmente na caracterização estrutural das mesmas e avaliação destes modelos com intuito de encontrar as relações entre estrutura e função.

Todas as proteínas de veneno de serpentes estudadas, as Fosfolipases A2 (PLA2) de *Crotalus durissus cascavella*, de *Crotalus durissus terrificus* e de *Bothrops jararacussu*, foram obtidas através de colaboração com o Prof. Marcos Hikari Toyama, da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Unidade de São Vicente) e do Instituto de Biologia da UNICAMP.

As proteínas Aldose Redutases (AR) de semente de milho, tanto a AKR4C7 de endosperma quanto a AKR4C13 de embrião, foram fornecidas pelos pesquisadores Sylvia Moraes de Sousa (EMBRAPA de Sete Lagoas) e José Andrés Yunes (Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini).

2.2 – Caracterização espectroscópica

2.2.1 – Dicroísmo Circular

A espectroscopia por Dicroísmo Circular (CD) é um método experimental de análise apropriado para avaliar a estrutura secundária de proteínas (hélices- α , folhas- β e voltas) em solução, sendo caracterizado como um meio rápido e econômico, devido as pequenas quantidades de amostra necessárias, no estudo da integridade e, principalmente, mudanças conformacionais e desenovelamento de proteínas [2, 3]. Nesta técnica, geralmente é utilizada luz circularmente polarizada na faixa do ultravioleta (UV) distante (~180 a 260 nm). Esta radiação incide em compostos ou grupos assimétricos e é absorvida. No caso de proteínas, os cromóforos para a luz circularmente polarizada são as ligações peptídicas que absorvem esta radiação de maneira desigual à direita e à esquerda. Essa diferença na absorção faz com que a amplitude da componente mais absorvida seja menor do que a amplitude da menos absorvida, podendo ser medida por um espectropolarímetro de CD [4].

O espectro de CD pode ser considerado tipicamente de hélices- α quando apresenta um espectro contendo duas bandas negativas em ~208 nm e ~222 nm e uma banda positiva em ~192 nm. Já o espectro característico de folhas- β apresenta uma banda negativa em ~216 nm e uma banda positiva em ~195 nm [5]. Como a absorção da radiação ocorre de maneira desigual à direita e à esquerda, o sinal de CD representa a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada nestas direções. Em geral, o sinal de absorbância é representado em termos de elipticidade (θ), em miligraus, podendo ainda ser representada após a normalização do sinal de CD pela concentração em mol/L (M) da proteína em solução e pelo caminho óptico (d) percorrido pela luz, em termos de

2.2 Caracterização espectroscópica

dicroísmo circular molar ($\Delta \varepsilon$) [6].

Além de avaliar a integridade estrutural de proteínas, mudanças conformacionais, acompanhar processos de desnaturação (*unfolding*) e renaturação (*folding*) [7], é possível ainda, através da técnica de Dicroísmo Circular, estimar a composição dos elementos de estrutura secundária destas macromoléculas [8]. Diferentes algoritmos de deconvolução espectral estão disponíveis gratuitamente para tal propósito [9, 10], principalmente através do servidor *DichroWeb* (http://dichroweb.cryst.bbk. ac.uk/html/home.shtml) [11], que também engloba uma série de bancos de dados de referência. Porém, tais análises são algumas vezes imprecisas, o que torna crucial a análise criteriosa dos resultados obtidos [12].

Existem ainda diversas ferramentas de bioinformática associadas com a técnica de Dicroísmo que permitem o cálculo teórico dos espectros de CD para a proteína de interesse a partir de suas coordenadas atômicas (*DichroCalc*, http://comp.chem.nottingham.ac.uk/dichrocalc/) [13] e outras, talvez as mais amplamente utilizadas, que são empregadas na determinação dos elementos de estrutura secundária a partir da sequência de aminoácidos, sendo um dos servidores mais amplamente utilizado para tal propósito o *PSIPRED* (http://bioinf4.cs.ucl.ac.uk: 3000/psipred/) [14].

Nos estudos desta tese as proteínas de interesse foram caracterizadas por Dicroísmo Circular em tampão de fosfato de sódio 10 mM, utilizando um espectropolarímetro Jasco J-720. Os espectros de CD foram adquiridos para as proteínas nas concentrações apropriadas, utilizando uma cuveta de quartzo de caminho óptico igual a 1 mm, com tempo de resposta de 1 s, a temperatura ambiente. Diversas varreduras foram acumuladas para cada amostra e todos os espectros foram corrigidos pela subtração do sinal do tampão (branco). Os espectros também foram tratados utilizando um procedimento de suavização por média móvel com passo de

convolução igual a 5. Adicionalmente, a estabilidade térmica de uma das proteínas foi avaliada através de estudos de desnaturação utilizando um controlador de temperatura do tipo *Peltier* (PTC-423S/15) com taxa de aquecimento de 1 °C/min e uma cuveta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Mudanças no sinal de CD foram monitoradas a 222 nm na região de 20 a 90 °C.

2.2.2 – Espectroscopia UV/VIS

Experimentos típicos de cinética enzimática foram realizados na avaliação de uma possível reação entre componentes do tampão de cristalização de uma das proteínas estudadas. Estes estudos foram realizados em um espectrofotômetro UV/VIS Hitachi U3000 à temperatura ambiente. A provável reação foi monitorada acompanhando a diminuição do sinal de absorbância a 340 nm, correspondente ao consumo do cofator enzimático NADPH, com o decorrer do tempo do experimento.

2.3 – Espalhamento de Raios X (SAXS)

A técnica de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS) permite estudar proteínas e outras macromoléculas em solução, muitas vezes em condições próximas das fisiológicas. Este método possibilita avaliar mudanças conformacionais e, no estado de oligomerização em função de variações, nas condições experimentais ou interações com outras espécies [15, 16]. Uma importante aplicação da técnica de SAXS que tem se tornado cada vez mais popular é a obtenção de modelos estruturais de baixa resolução para macromoléculas em solução a partir da curva de espalhamento experimental [17, 18].

Em soluções monodispersas, a intensidade do espalhamento dos

Raios X depende do contraste entre o solvente e as partículas, da forma das macromoléculas e das interações estabelecidas. A intensidade de espalhamento (*I*) é determinada experimentalmente em função do vetor de espalhamento (*q*) que, por sua vez, depende do comprimento de onda da radiação (λ) e do ângulo de espalhamento (2 θ , ângulo entre a direção do feixe incidente e a direção de observação), onde |*q*| = (4 π / λ) sen θ . A distribuição randômica das partículas, em solução, faz com que o espalhamento de Raios X seja isotrópico. Assim, no caso de soluções monodispersas de partículas que não interagem entre si, a intensidade de espalhamento *I*(*q*) é proporcional à média temporal do quadrado da amplitude do espalhamento (*A*) em todas as direções para uma única partícula: $I(q) \propto \langle A^2(q) \rangle_{\Omega}$, onde $\langle \rangle_{\Omega}$ corresponde à média espacial da partícula em solução [19].

A partir do conhecimento de l(q) é possível obter informações sobre várias características do sistema sob avaliação, tais como raio de giro (R_g) , massa molecular (*Molecular Weight*, MW) e a função de distribuição de distâncias ou p(r) das partículas espalhadoras [20]. Esta última fornece uma idéia de frequência das distâncias r entre dois centros espalhadores de uma partícula, figura 2.1.

O raio de giro da macromolécula corresponde à raiz quadrada da distância quadrática média entre os elementos de volume e o centro de massa eletrônico do objeto espalhador. Seu conhecimento pode ser muito útil na investigação estrutural de partículas monodispersas em solução, pois um aumento ou diminuição do mesmo, provocado por qualquer variação nas condições experimentais, indica mudança nas posições relativas entre os centros espalhadores que compõem a partícula. O valor de R_g pode ser obtido a partir da porção da curva de espalhamento para valores de q muito pequenos onde é válida a chamada aproximação de Guinier: $I(q) \simeq I(0)exp(-1/3R_q^2q^2)$ [21]. Esta equação é válida para sistemas de

partículas idênticas e diluídas na região q_{max} . $R_g \le 1,3$. Representando a intensidade em escala ln *I versus* q^2 , espera-se um comportamento linear com inclinação igual a $-1/3R_g^2$. Alternativamente, o raio de giro também pode ser obtido através da p(r).



Figura 2.1: Função de distribuição de distâncias teórica para diferentes corpos geométricos. Por exemplo, a *p*(*r*) simétrica ao longo dos eixos das distâncias corresponde à esfera representada em vermelho, sendo o diâmetro da esfera igual à distância máxima entre dois centros espalhadores desta partícula. Adaptada da referência [16].

Uma análise gráfica simples realizada através do chamado *Kratky plot* (*I q² versus q*) permite avaliar o grau de globularização de proteínas em solução [22]. A forma do *Kratky plot* é sensível ao estado de conformação da macromolécula espalhadora. Sistemas globulares corretamente eno-

velados possuem curvas com um máximo bem definido, enquanto para aqueles completamente desenovelados, ao invés de um pico máximo, é observado um platô ou uma função crescente para os maiores valores do vetor de espalhamento, figura 2.2.



Figura 2.2: Ilustração da forma típica do *Kratky plot* para uma proteína corretamente enovelada, parcialmente desenovelada e outra completamente desenovelada. Adaptada da referência [23].

Para a estimativa da massa molecular de proteínas em solução, através de dados de SAXS, existem diferentes opções. Uma estratégia experimental é através da extrapolação da intensidade dos Raios X espalhados para o valor de q = 0, I(0), utilizando outra proteína de massa molecular conhecida como padrão [24]. Outros dois métodos simples para tal objetivo são baseados no *Kratky plot*. O primeiro está baseado numa

equação definida a partir do pico máximo deste gráfico, cujos valores para proteínas de diferentes massas moleculares foram utilizados no estabelecimento de uma curva de calibração [25]. O segundo, e provavelmente o mais prático, é baseado no invariante *Q*, uma integral calculada a partir do *Kratky plot* e que está implementada na ferramenta disponível *online* chamada *SAXS MoW* (http://www.ifsc.usp.br/~saxs/saxsmow.html) [26].

Os experimentos de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos, apresentados nesta tese, foram realizados nas linhas de luz D11A-SAXS1 e D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) mediante a submissão de propostas de pesquisa específicas. A linha D11A-SAXS1, quando em funcionamento, empregava um detector unidimensional a gás, enquanto a linha D02A-SAXS2 é equipada com detector bidimensional CCD (MarResearch). Dados de SAXS foram coletados para as amostras em tampões apropriados, utilizando o comprimento de onda igual a 1,488 Å e a 4 °C. Correções nas intensidades do espalhamento e subtração do sinal dos respectivos tampões foram realizadas. Os programas *TRAT1D* [27] e *Fit2D* [28] foram empregados nestas correções e na integração dos dados originais coletados nas linhas SAXS1 e SAXS2, respectivamente. No caso específico dos dados coletados na linha SAXS2 utilizando o detector MarCCD não foi possível estimar os erros das medidas em decorrência das características desse equipamento.

Diversos programas do pacote *ATSAS* [29] destinados a análises e processamentos de dados de SAXS para biomoléculas são disponibilizados gratuitamente pelo grupo do Dr. Dmitri Svergun (*BioSAXS*, http: //www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/). As curvas de espalhamento foram inspecionadas e tiveram suas médias realizadas com o programa *PRIMUS* [30]. As funções p(r) foram calculadas através da transformada indireta das curvas de SAXS com o programa *GNOM* [31]. Modelos de baixa resolução foram recuperados usando um procedimento

ab initio implementado no programa *GASBOR* [32]. Nesta aproximação, a proteína estudada é representada como uma cadeia de resíduos fictícios (*Dummy Residues*, DRs) centrados na posição de carbonos alfa (C_{α}) enovelados de forma a minimizar iterativamente a diferença entre a curva de espalhamento experimental e aquela calculada para o modelo, sendo que esta discrepância é minimizada através de um algoritmo de arrefecimento simulado (*simulated annealing*). Entretanto, devido ao baixo conteúdo de informação inerente à técnica de SAXS, na abordagem por DRs há mais parâmetros a determinar do que dados disponíveis, de modo que os modelos de baixa resolução não são únicos, ou seja, para uma mesma curva experimental diferentes modelos são gerados após cada processamento. Como o *GASBOR* não rende uma solução única, diversos modelos foram preparados e então uma média espacial para uma série deles realizada com o programa *DAMAVER* [33], incluindo a exclusão de modelos anômalos (*outliers*).

A técnica de SAXS torna-se mais poderosa à medida que é utilizada em conjunto com outros métodos que permitem entender e julgar os resultados obtidos. Neste ponto, a utilização de modelos de alta resolução, que apresentam uma identidade sequencial elevada com a molécula em estudo, permite a interpretação destes modelos de baixa resolução. Porém, além da elevada identidade sequencial, os modelos de alta resolução disponíveis também devem ser escolhidos com base na menor discrepância entre a curva de espalhamento experimental e a computada para estes modelos, o que pode ser feito com o programa *CRYSOL* [34]. Após esta série de etapas os modelos de coordenadas atômicas são finalmente superpostos aos envelopes de SAXS com o programa *SUPCOMB* [35].
2.4.1 – Cristalização

Um grande obstáculo na obtenção de modelos estruturais de alta resolução através da técnica de Cristalografia de Proteínas é a identificação de condições de cristalização destas espécies. Um cristal de proteína consiste de moléculas idênticas que se repetem em um arranjo tridimensional, ordenado e periódico, mantidos por interações eletrostáticas (pontes salinas), ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações entre dipolos nas regiões de contato [36]. A maior parte da superfície dessas macromoléculas, geralmente globulares, interage com o solvente que, por sua vez, preenche o volume cristalino não ocupado por elas. Dessa forma verificam-se duas fases distintas na constituição do cristal de proteína, uma sólida e outra líquida, que os tornam frágeis ao manuseio [37].

Para que se forme um cristal de proteína, sua solução deve ser levada ao estado de supersaturação. Ao retornar deste estado, termodinamicamente instável, ocorre a cristalização da macromolécula pela diminuição lenta da sua solubilidade. Caso esse processo ocorra muito rapidamente, ocorrerá precipitação da proteína. Durante a cristalização propriamente dita, ocorre inicialmente a fase de nucleação, formação de aglomerados num equilíbrio entre formação e solubilização, seguida do estágio de crescimento, quando moléculas de proteína são incorporadas aos aglomerados iniciais, e finalmente a cessação do crescimento, quando o sistema atinge um estado de insaturação e a taxa de incorporação de moléculas se iguala à saída das mesmas [36].

A obtenção de bons monocristais da proteína de interesse, cristais com tamanho normalmente entre 0,1-0,2 mm e que apresentem um padrão de difração de Raios X adequado, não é uma etapa trivial. Ela requer

uma identificação das condições iniciais de cristalização, sendo geralmente necessário um refinamento exaustivo dessas condições. A forma mais amplamente empregada na identificação das condições iniciais de cristalização é a utilização de formulações (*kits*) de soluções apropriadas para esta finalidade baseadas no método conhecido por matriz esparsa (*sparse matrix screens*) [38], no qual uma série de soluções utilizadas na cristalização de proteínas conhecidas é empregada. O refinamento destas condições promissoras é realizado pela variação dos parâmetros identificados inicialmente, em geral, concentração das substâncias, pH dos tampões, concentração da proteína e, em algumas vezes, temperatura (*grid screens*) [39].

Dentre os métodos mais utilizados e viáveis para a cristalização de proteínas destaca-se o método da difusão de vapor, no qual à medida que o volume da solução de cristalização diminui pela liberação de solvente, a concentração da proteína e do agente precipitante é aumentada. Em nossos estudos, normalmente são feitas dezenas de placas de cristalização numa das variações do método da difusão de vapor, chamada método da gota suspensa (*hanging drop method*). Para cada proteína, placas de cristalização correspondendo a 24 condições testadas (24 poços de cristalização) são montadas. A representação esquemática destas placas de cristalização, bem como a de um poço, que representa um experimento no método da gota suspensa são apresentados na figura 2.3.

Além do método da gota suspensa, outra importante variação do método de difusão de vapor chamada método da gota sentada (*sitting drop method*) é, em muitos casos, mais apropriada, como em situações nas quais os componentes da solução da gota promovem formação de uma "nata", onde cristais da proteína aderem. Outros dois métodos alternativos ao método da difusão de vapor, porém menos utilizados, são a cristalização por diálise e o banho em óleo (*microbatch-under-oil*) [40]. Po-



Figura 2.3: Ilustração do método de cristalização da gota suspensa por difusão de vapor, incluindo a representação esquemática de uma placa de cristalização com 24 poços e, mais detalhadamente, de um poço de cristalização com suas diferentes partes: solução precipitante, lamínula de vidro silanizada e gota suspensa (mistura da solução da proteína com a solução do poço). A lamínula é selada ao poço utilizando uma graxa de silicone ou outro material inerte. Adaptada da figura encontrada no site http://www.doe-mbi.ucla.edu/ ~sawaya/m230d/Crystallization/tipsandtricks.html.

rém, em alguns casos, mesmo após a utilização de diferentes condições e métodos para a cristalização de proteínas, somente núcleos ou pequenos cristais inadequados aos experimentos de difração de Raios X são formados. Estes problemas podem ser contornados utilizando a técnica de *Seeding*, na qual cristais previamente formados são quebrados para a obtenção de "sementes" que, por sua vez, são "semeadas" em novas gotas de cristalização com a concentração da proteína ou agentes precipitantes reduzida [41]. Ainda em outras situações podem ser utilizados aditivos, em geral solventes orgânicos, pequenas moléculas, íons, cofatores e alguns detergentes que podem influenciar na formação de melhores cristais.

Bons monocristais não são necessariamente aqueles que apresentam uma morfologia externa mais regular. Resumidamente, como dito por Alex Cameron no livro editado por Terese Bergfors [39]: "É a ordem interna do cristal que importa em Cristalografia, não a aparência externa. Frequentemente elas estão aliadas, mas a única forma de verificar a qualidade do cristal é através da difração de Raios X". Este livro, *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*, é uma ótima referência sobre cristalização de proteínas, incluindo diversos exemplos e as principais técnicas utilizadas.

Os ensaios de cristalização desta tese foram realizados em sala apropriada mantida a 18 °C utilizando *kits* de soluções próprias para a cristalização de proteínas, *Crystallization Basic kit for Proteins* e *Crystallization Extension kit for Proteins* (Sigma-Aldrich). O método da gota suspensa foi empregado adicionando 500 μ L de cada solução precipitante em cada poço. Gotas contendo 2 μ L de solução precipitante (solução do poço) mais 2 μ L da solução de proteína (~10 mg/mL) foram feitas em lamínulas de vidro previamente silanizadas com clorotrimetilsilano (Sigma-Aldrich). Também foram realizados diversos experimentos de refinamento de con-

dições de cristalização das proteínas com intenção de melhorar a qualidade e tamanho dos cristais obtidos. Ainda foram preparadas placas de cristalização de ensaios de *soaking* (banho em soluções apropriadas de cofatores e/ou substratos/análogos de substrato), utilizando aditivos e ainda experimentos de *Seeding*. Uma série de ensaios de cristalização foi realizada com a utilização do robô *Mosquito* (*Mosquito Nanodrop crystallisation robot*) do *York Structural Biology Laboratory* (YSBL) na avaliação de condições iniciais de cristalização.

2.4.2 – Difração de Raios X

Experimentos de difração de Raios X são a última etapa verdadeiramente experimental no processo de obtenção de modelos cristalográficos. Todas as etapas subsequentes envolvem somente esforços computacionais, podendo ser repetidas e variadas diversas vezes, desde que se tenha um conjunto de dados de alta qualidade disponível [42]. O principal objetivo da coleta de dados de Cristalografia é extrair a informação estrutural necessária do cristal dado um tempo experimental disponível, muitas vezes restrito, e também um tempo de vida do cristal exposto ao feixe de Raios X relativamente curto. Para isso, normalmente, é necessária a aquisição de um conjunto completo e preciso de intensidades das reflexões na maior resolução possível [43].

Entre outros parâmetros, a completeza e a resolução máxima do conjunto destacam-se como fatores que merecem uma atenção especial durante uma coleta de dados. Os dados em um experimento de difração de Raios X consistem de um conjunto de índices e suas intensidades associadas, com suas incertezas. Ambos devem ser completos, ou seja, os índices relacionados aos diferentes planos cristalográficos devem ser medidos pelo menos uma vez e as intensidades associadas a cada uma destas

reflexões devem ser adquiridas com a maior relação sinal-ruído possível. Infelizmente nem todas as intensidades são fortes. Como intensidades fracas também contêm informação, estas não devem ser negligenciadas. A omissão sistemática de dados distorcerá todos os mapas de densidade eletrônica que serão obtidos na construção do modelo estrutural [44].

Uma boa estratégia de coleta de dados de difração pode variar consideravelmente dependendo de muitos fatores, tais como parâmetros da cela unitária e simetria do cristal, sua orientação no goniômetro, sua mosaicidade, susceptibilidade a danos provocados pela radiação e limite de resolução da difração, tão bem como o propósito para o qual os dados são necessários [45]. Uma escolha incorreta de estratégia para a coleta de dados pode levar a falha do experimento [46].

O método da oscilação é normalmente empregado na coleta de dados de difração de Raios X de cristais de macromoléculas, tendo como resultado experimental um conjunto de imagens bidimensionais com um grande número de reflexões (pontos de difração, picos de difração ou *spots*) [47]. A intensidade da difração dos cristais, o tamanho e a forma dos *spots* são afetados pelas dimensões do feixe de Raios X em relação ao tamanho e também pela forma do cristal. Cristais que difratam fortemente não necessitam de um feixe de Raios X tão intenso quanto aqueles que difratam menos.

Muitas estruturas de proteínas podem ser resolvidas usando difratômetros de laboratório, mas para cristais que difratam fracamente são necessárias fontes de Raios X de elevada intensidade, tais como aquelas disponíveis em um Síncrotron. O comprimento de onda da radiação produzida em um difratômetro convencional é fixo, com um valor característico para o metal empregado como fonte dos Raios X, normalmente cobre $\lambda(K_{\alpha}) = 1.5418$ Å. Já no caso de linhas de luz em Síncrotron, frequentemente existe uma diversidade de comprimentos de onda que podem

ser escolhidos. Para uma coleta inicial de dados de difração de cristais de macromoléculas em um Síncrotron, qualquer valor de comprimento de onda próximo de 1 Å pode ser utilizado, desde que se garanta uma alta intensidade do feixe, que pode variar a depender das características da fonte e dos dispositivos ópticos da linha de luz [46].

Um importante parâmetro a ser considerado durante a coleta de dados de cristais de macromoléculas é a dose da radiação utilizada. Danos provocados pela radiação durante a coleta de dados levam à redução da resolução, mudanças nos parâmetros da cela unitária e aumento da mosaicidade. Também podem ocorrer modificações químicas na estrutura como resultado da absorção da radiação. Técnicas de criocristalografia têm permitido a redução dos efeitos danosos dos Raios X durante a coleta de dados de difração [48]. Nestas, o líquido-mãe, solução onde o cristal foi crescido e que forma canais de solvente dentro do cristal e ao redor dele, é solidificado no estado amorfo vítreo com a amostra preservando seu estado de ordem cristalina e propriedades de difração pela adição de uma substância crioprotetora. O cristal é então capturado da solução de cristalização com uma pequena alça, em geral de nylon, banhado rapidamente na solução crioprotetora e imerso em nitrogênio líquido ou exposto diretamente ao fluxo de nitrogênio gasoso a cerca de 100 K [49]. Um ótimo criotampão é aquele que se contrai no resfriamento, na mesma ou em similar proporção que a rede cristalina, sem provocar tensões, de modo a causar o mínimo efeito na ordem do cristal [50].

Em nossos trabalhos, após a obtenção de cristais das proteínas de interesse, os experimentos de difração de Raios X foram realizados nas linhas de luz D03B-MX1 e W01B-MX2 do LNLS, ID14-1 e ID14-4 do *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) e I02 do *Diamond Light Source* (*Diamond Synchrotron*) mediante a submissão de propostas de pesquisa específicas, sendo que no caso específico da coleta no *Dia*-

mond os dados adquiridos não foram utilizados na resolução das estruturas apresentadas nesta tese pois melhores conjuntos de difração de Raios X para os mesmos sistemas foram coletados posteriormente no ESRF. Diversas caracterizações preliminares de cristais também foram realizadas em geradores de Raios X do tipo Ânodo Rotatório, tanto no LNLS quanto no YSBL. Danos causados ao cristal pela radiação foram evitados mantendo a temperatura constante (~100 K), através de fluxo de nitrogênio gasoso e utilizando substâncias crioprotetoras como etilenoglicol, glicerol e 2-metil-2,4-pentanediol (hexanediol ou MPD), capazes de impedir a formação de água cristalina na amostra. Após os testes com os crioprotetores, coletamos dados para os melhores cristais utilizando radiação num comprimento de onda fixo e detectores CCD (MarResearch e ADSC).

2.5 – Cristalografia: parte computacional

Uma descrição mais detalhada dos diversos aspectos envolvidos na técnica de Cristalografia, incluindo os fenômenos físicos, fundamentação matemática, descrição dos métodos e detalhes experimentais, podem ser encontrados em diferentes literaturas de referência, entre elas, *Protein crystallography* (Blundell & Johnson) [51], *Preparation and analysis of protein crystals* (McPherson) [52], *Principles of protein X-ray crystallography* (Drenth) [53] e *Fundamentals of crystallography* (Giacovazzo) [54]. A seguir serão apresentados as principais etapas do processamento de dados de Cristalografia e os *Sofwares* utilizados nesta etapa computacional desta tese.

2.5.1 – Redução de dados

Ao iniciar a etapa computacional de Cristalografia as imagens bidimensionais, contendo as reflexões correspondentes ao padrão de difração de Raios X do sistema em estudo, são processadas numa etapa conhecida por redução de dados, resultando num conjunto final de fatores de estrutura do cristal avaliado. Estes fatores de estrutura (F_h ou F_{hkl}) contabilizam as contribuições de todos os centros espalhadores para cada reflexão (hkl), sendo que o tipo de elemento químico e suas posições na cela unitária do cristal determinam, conjuntamente, a amplitude deste espalhamento e suas relações de fase [55].

No processo de redução de dados são determinadas as intensidades das reflexões, as reflexões parciais são somadas e as reflexões relacionadas por simetria são reduzidas. De modo prático, este processo consiste basicamente de duas etapas: integração e escalonamento.

Na integração dos dados, a partir da análise das posições dos pontos de difração, a rede de Bravais do sistema é determinada (indexação), incluindo as dimensões da cela unitária. Em seguida, parâmetros do aparato experimental (distância amostra-detector, ângulo de inclinação do detector com relação ao feixe de Raios X, etc.), da orientação do cristal e de sua mosaicidade são pré-refinados. Assumindo a posição das reflexões a partir deste refinamento preliminar, a integração das intensidades (*I*) propriamente dita é feita por ajuste de perfil (*profile fitting*), incluindo a estimativa dos erros das intensidades de cada reflexão $\sigma(I)$. Em seguida, o número de reflexões parciais é computado, diversas correções são aplicadas aos *overlaps, overloads*, correções de Lorentz e de polarização, e, finalmente, as reflexões simetricamente relacionadas são reduzidas a uma única unidade assimétrica (ASU) no espaço recíproco, conforme o grupo de Laue previamente determinado [56].

Durante a coleta de dados, fatores como tempo de exposição e instabilidades no feixe de Raios X, como é observado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela diminuição da intensidade da radiação com o tempo de vida do feixe, geram imagens de difração em diferentes escalas de intensidade. Na etapa de escalonamento são determinados os fatores de escala que serão aplicados às intensidades das reflexões, e aos erros associados a elas, para que todas as imagens fiquem numa única escala. Por fim, é feita a média das reflexões de mesmos índices de Miller (*hkl*) e a rejeição de reflexões anômalas (*outliers*) [57, 58].

Ao final do processo de redução dos dados é imprescindível uma análise cuidadosa das estatísticas resultantes que podem, por sua vez, indicar problemas com o aparato experimental, cristal, erros de estratégia para a coleta de dados, etc., além de servir para avaliar a resolução real do conjunto de dados, identificar regiões de oscilação ruins (bad images) e analisar possíveis danos por radiação [59]. Entre estas estatísticas e parâmetros podemos citar o comportamento das escalas e fatores de temperatura (B-fator), $H\sigma(I)$ contra as faixas de resolução, número de rejeições por imagem, completeza, multiplicidade, desvio padrão das reflexões (cheias e parciais), correlações dentro do conjunto de dados e R_{merge} também em relação à resolução. Este último, também chamado R_{sum} , é uma medida da dispersão das intensidades das reflexões, relacionadas por simetria e também aquelas medidas mais de uma vez, em torno da média: $R_{merge} = \sum_{h} \sum_{j} |I_{hj} - \langle I_{h} \rangle| / \sum_{h} \sum_{j} \langle I_{h} \rangle$, onde I_{hj} é a j^{th} observação da reflexão h e $\langle I_h \rangle$ é a intensidade média para todas as observações j da relfexão h [60]. O R_{merge} é uma medida da coerência interna de um conjunto de dados, assumindo valores típicos para proteínas entre 0,02-0,35, de acordo com a faixa de resolução.

2.5.2 – O problema das fases

De posse de um conjunto de dados único contendo os fatores de estrutura (\mathbf{F}_{h}) do cristal estudado, a densidade eletrônica $\rho(x, y, z)$ da ASU poderia ser calculada e, em seguida, o modelo atômico da molécula cristalizada determinado, já que os fatores de estrutura estão matematicamente relacionados à densidade eletrônica através de uma Transformada de Fourier (\mathscr{F}): $\rho(x, y, z)$ $\mathscr{F}_{h} \mathbf{F}_{h} = |\mathbf{F}_{h}| exp(i\varphi_{h})$. Porém, num experimento de difração, somente a informação correspondente às amplitudes $|\mathbf{F}_{h}|^{2}$ é medida: $I_{hkl} \propto |\mathbf{F}_{h}|^{2}$, não sendo possível medir diretamente as fases φ_{h} dos fatores de estrutura, ou seja, não é possível obter informação sobre as fases relativas com as quais os elétrons dos átomos, no interior do cristal, espalham a radiação. Este é um problema central em cristalografia chamado de problema das fases [61].

Embora não seja possível medir diretamente as fases, há mais de uma forma de solucionar esse problema: através de métodos diretos, da utilização do espalhamento anômalo, métodos de substituição isomorfa e ainda por substituição molecular.

Métodos diretos, também chamados faseamento *ab initio*, são baseados na obtenção das fases a partir das relações matemáticas entre certos grupos de reflexões, porém só são aplicáveis para sistemas pequenos e para conjuntos de dados com resolução melhor ou \simeq 1,0 Å [62, 63].

Métodos de espalhamento anômalo estão baseados na absorção dos Raios X, utilizados no experimento de difração. Neste caso deve existir alguma espécie no cristal que absorva Raios X num comprimento de onda apropriado, por exemplo, átomos de enxofre, selênio ou outros metais pesados. Esta absorção provoca mudanças nas amplitudes dos fatores de estrutura que podem ser usadas na obtenção das fases. O espalhamento anômalo pode ser empregado utilizando-se um único com-

primento de onda da radiação na borda de absorção do elemento espa-Ihador (*Single-wavelength anomalous dispersion*, SAD) [64, 65], ou ainda em três diferentes comprimentos de onda: abaixo, acima e na borda de absorção do átomo espalhador (*Multi-wavelength anomalous dispersion*, MAD) [66, 67].

Métodos de substituição isomorfa, também chamados métodos de átomos pesados, permitem a obtenção das fases através da incorporação de átomos pesados no sistema de interesse. Neste método, pela identificação das posições destes elementos no cristal são obtidas fases iniciais que servem de ponto de partida para a construção do modelo [68].

Por fim, um método que vem se tornando cada vez mais popular e que foi o único utilizado na resolução das estruturas desta tese é o método da substituição molecular [69, 70]. Neste método, as fases podem ser estimadas a partir do modelo atômico de uma proteína previamente resolvida (modelo de busca) e que seja parecida com a proteína de interesse. Esta abordagem vem ganhando cada vez mais importância à medida que os bancos de dados de estruturas resolvidas crescem, o que aumenta as chances de encontrar um modelo de busca adequado [71].

A substituição molecular consiste, basicamente, no processo de orientar (através de um operador de rotação) e posicionar (através de um operador de translação) o modelo de busca no sistema cristalino em estudo [72, 73]. Este método é preferencialmente escolhido pela facilidade de uso, rapidez e funcionalidade [74]. Nos casos em que há um modelo de busca adequado, as operações de rotação e translação serão encontradas com maior facilidade e as fases calculadas estarão mais próximas das fases verdadeiras. Em caso de baixa identidade, o mapa obtido pode ser não-interpretável mesmo que as soluções sejam encontradas [75]. Para se ter uma idéia, requerimentos mínimos são um modelo de busca que compreende em torno de 70 % do tamanho da molécula cristalizada, com

uma identidade sequencial maior que 30 %. Em alguns casos é possível concatenar domínios de mais de uma proteína para formar um modelo de busca que corresponda a uma fração maior da molécula alvo [76, 77]. Um ponto importante a ser lembrado é que, além de permitir a construção dos mapas de densidade eletrônica para a proteína de interesse, este método também gera um primeiro modelo a ser posteriormente refinado.

2.5.3 – Refinamento e validação dos modelos

Após a obtenção das fases e de um modelo de coordenadas atômicas iniciais, como no caso da solução da estrutura por substituição molecular, seus ajustes e correções são realizados através da visualização gráfica dos mapas de densidade eletrônica: mapas de trabalho $\rho(x, y, z) = (1/V) \sum_{k} \sum_{l} (|2m|\boldsymbol{F}_{o}| - D|\boldsymbol{F}_{c}||) exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha'_{calc})],$ também chamado resumidamente $2|F_{o}|-|F_{c}|$, e mapas de diferença $\rho(x, y, z) = (1/V) \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} (|\boldsymbol{m}|\boldsymbol{F}_{o}| - \boldsymbol{D}|\boldsymbol{F}_{c}||) exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{calc}')],$ resumidamente $|F_{o}|$ - $|F_{c}|$, onde *m* e *D* são pesos utilizados para evitar erros nos mapas de densidade eletrônica decorrentes de um modelo imperfeito [78, 79]. Estes mapas permitem a visualização das regiões que já estão modeladas corretamente no caso dos mapas de trabalho (em geral regiões representadas como uma superfície de contorno em azul) e, no caso dos mapas de diferença, regiões onde os átomos estão modelados incorretamente (superfícies de contorno em vermelho) ou ainda regiões onde átomos ou grupos necessitam ser modelados (superfícies de contorno em verde) [80, 81].

Após uma série de ajustes, novas fases são calculadas para o novo modelo atômico num processo iterativo que se repete por diversos ciclos gerando, idealmente, melhores fases a cada ciclo. Além das posições dos átomos, seus respectivos fatores de temperatura, medida do movimento

térmico dos átomos, também são refinados. Este processo continua até que a diferença entre os dados de difração experimentais (fatores de estrutura observados, $F_{\rm o}$) e os fatores de estrutura calculados para o modelo $(F_{\rm c})$ seja mínima. Esta medida do acordo entre $F_{\rm o}$ e $F_{\rm c}$ é avaliada pela estatística chamada R_{factor} : $R_{factor} = \sum w ||F_o| - k|F_c|| / \sum w |F_o|$, onde w e k são um fator de peso e um fator de escala, respectivamente. Uma guantidade similar chamada R_{free} , calculada para um subconjunto de reflexões entre 5-10 % sorteadas ao final do processo de redução de dados e separadas daquelas utilizadas na construção do modelo, é utilizada como conjunto de validação externa, permitindo uma avaliação do modelo final não tendenciosa do que através do R_{factor} [82, 83]. Em Cristalografia de Proteínas, onde a razão entre dados observados e parâmetros a ajustar é geralmente bastante desfavorável, a utilização do R_{free} é essencial. Podese mostrar que o decréscimo no R_{free} está correlacionado à melhoria do modelo. Valores típicos para estes dois parâmetros em diferentes faixas de resolução podem ser encontrados na referência [84].

Além destas estatísticas, critérios químicos e geométricos são importantes na etapa de avaliação dos modelos finais chamada validação. Características das ligações químicas como distribuição dos comprimentos e ângulos de ligação, disposição das ligações de hidrogênio e estereoquímica são importantes parâmetros complementares de medida da qualidade do modelo final [85]. Particularmente, a avaliação dos ângulos diedrais $\phi e \psi$, definidos em termos dos átomos que compõem as ligações peptídicas, pela análise do gráfico de Ramachandran através do número de *outliers*, deve ser considerada na validação dos modelos [86, 87]. De posse do modelo devidamente validado, em geral, procede-se a sua deposição no banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas, o *Protein Data Bank* (PDB, www.rcsb.org).

2.5.4 – Softwares utilizados

Os processamentos dos dados cristalográficos coletados nos trabalhos desta tese foram realizados, guase em sua totalidade, com programas do pacote computacional gratuito chamado Collaborative Computational Project Number 4 (CCP4) [88, 89]. Os dados de difração de Raios X coletados para as diferentes proteínas foram integrados com o programa MOSFLM [90]. O processo de redução de dados foi finalizado utilizando o programa SCALA [91] na determinação das escalas e estatísticas de análise dos dados. Em todos os casos o problema das fases foi resolvido por substituição molecular, de modo assistido utilizando os programas AMoRe [92, 93] e MOLREP [94], ou ainda utilizando o procedimento automático implementado nos programas BALBES [76] e MrBUMP [77]. O refinamento estrutural foi realizado utilizando o programa REFMAC5 [78] e o programa gráfico *Coot*, [81] para os ajustes das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. A validação dos modelos obtidos foi realizada preliminarmente no próprio programa *Coot* [81] e, em seguida, com os programas PROCHECK [95] e no servidor MolProbity [96, 97]. Uma descrição detalhada das diferentes funcionalidades de cada programa do pacote CCP4 utilizado nesta tese pode ser encontrada em www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html.

Capítulo 3

Fosfolipases A2 de venenos de serpentes Brasileiras

Serpentes são animais de grande importância em questões de saúde pública de diversos países pela capacidade que alguns grupos desses animais apresentam de causar acidentes graves. Cerca de 20 % da fauna de serpentes encontradas no Brasil são capazes de inocular veneno em suas presas. Esse grupo, chamado de peçonhentas, apresenta um aparelho inoculador de veneno, cuidadosamente elaborado pela natureza para esse propósito. O Brasil possui uma fauna de serpentes composta por cerca de 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros e 9 famílias [98]. Destas, apenas duas famílias (Elapidae e Viperidae) congregam as espécies peçonhentas. A fauna brasileira inclui 5 gêneros de viperídeos que somam aproximadamente 30 espécies. Entre elas se destacam as espécies dos gêneros Crotalus e Bothrops, sendo a espécie *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) a que apresenta maior importância no Brasil, atingindo cerca de 90 % dos casos de acidentes ofídicos reportados [99].

Além de importante em questões de saúde pública, a peçonha ou ve-

neno de serpentes é particularmente interessante porque apresenta um amplo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas. Diversos estudos científicos têm sido realizados com intenção de identificar e isolar componentes dos venenos responsáveis por estas diferentes propriedades em sistemas biológicos; entre eles pode-se destacar a descoberta de enzimas do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) que agem sobre proteínas do sangue promovendo a liberação de um polipeptídio chamado bradicinina [100], largamente utilizado em medicamentos para controle de hipertensão arterial e composto que serviu como protótipo molecular para o desenvolvimento do Captopril (Bristol-Myers Squibb), um importante anti-hipertensivo.

Nos trabalhos desta tese estudamos proteínas que pertencem à família dos viperídeos: duas proteínas oriundas do veneno de serpentes do gênero Crotalus (*Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus terrificus*, que são cascavéis encontradas na região nordeste e sul do Brasil, respectivamente) e uma proteína purificada do veneno de uma serpente do tipo Bothrops (*Bothrops jararacussu*). A seguir, apresentaremos os resultados obtidos na caracterização estrutural de diferentes enzimas obtidas do veneno destas serpentes. Estas proteínas, chamadas fosfolipases A2 (PLA2s, EC 3.1.1.4), são importantes catalisadores da hidrólise de fosfolipídios pela clivagem da ligação *sn*-2 do grupo acila com o segundo carbono do esqueleto de glicerol, liberando como produtos ácidos graxos e lisofosfolipídios [101, 102].

3.1 – PLA2 de Crotalus durissus cascavella

A crotoxina é a principal toxina presente no veneno das serpentes crotálicas. Esta proteína é um heterodímero composto por duas subunidades: uma fosfolipase A2 (~14 kDa, componente básico) e um componente ácido denominado crotapotina (~9 kDa). As PLA2s do veneno de serpentes, além do seu papel de digestão da presa, apresentam um grau variado de ações farmacológicas que interferem em processos fisiológicos como inflamação, defesa antibacteriana, etc. [103]. Estudos recentes revelaram que o tratamento da enzima PLA2 isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* com o flavonóide morina, diminuiu sua atividade enzimática, bactericida e algumas propriedades farmacológicas, embora as atividades inflamatória e neurotóxica não tenham sido afetadas significantemente [104]. Nesta parte dos trabalhos investigamos o efeito de diferentes flavonóides na estrutura da PLA2 de *C. d. cascavella*.

3.1.1 – Tratamento com flavonóides e alteração nas propriedades farmacológicas

Flavonóides são compostos polifenólicos de ocorrência natural amplamente distribuídos em plantas e particularmente abundantes em citros. Estes produtos naturais são caracterizados por uma importante atividade antioxidante contra radicais livres, normalmente associados ao metabolismo normal de células aeróbicas [105]. Adicionalmente, estas substâncias apresentam interessantes propriedades antitumoral e antiinflamatórias associadas à sua habilidade de inibição de enzimas envolvidas na ativação celular [106]. Experimentos *in vitro* também demonstraram que estes compostos apresentam inibição dose-dependente da hidrólise de fosfolipídios por PLA2s secretórias (sPLA2s) e citossólicas (cPLA2s) [107, 108]. Por estas razões, surgiu o interesse em caracterizar funcional- e estruturalmente as modificações induzidas nas atividades enzimática, biológicas e farmacológicas da PLA2 de *C. d. cascavella* pelo tratamento com diferentes flavonóides escolhidos por nossos colaboradores. As fórmulas estruturais dos flavonóides estudados (quercetina, rutina,





Figura 3.1: Fórmulas estruturais dos flavonóides estudados.

Como outros flavonóides, quercetina, rutina, morina e naringina apresentam uma combinação de múltiplas hidroxilas substituindo um esqueleto básico de anéis contendo um grupo cetona e, nos casos da rutina e naringina, uma porção glicosídica [109]. Estudos de relações estruturaatividade com flavonóides demonstraram que as atividades antioxidantes e de inibição enzimática estão relacionadas com a posição, quantidade e natureza dos grupos substituintes, estado de oxidação destas moléculas e presença de glicosilação [106].

O efeito do tratamento da fosfolipase A2 purificada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* com os flavonóides quercetina, rutina, morina e naringina, sobre diversas propriedades desta macromolécula (enzimática, miotóxica, neurotóxica, de agregação plaquetária, formação de edema e bactericida), foi avaliado por colaboradores em diversos experimentos. Nestes estudos foi observado que o tratamento químico da PLA2 com os flavonóides levou a uma alteração significativa das capacidades

catalítica, miotóxica, neurotóxica, de agregação plaquetária e bactericida. Porém, não foi verificada apreciável modificação da capacidade inflamatória desta enzima pela formação de edema em patas de ratos. Adicionalmente, análises das modificações químicas induzidas por estes flavonóides nos resíduos de aminoácidos mostraram que este tratamento químico modificou, predominantemente, os resíduos aromáticos (triptofanos, fenilalaninas e tirosinas) e histidinas [104].

Com finalidade de também avaliar os efeitos deste tratamento sobre a estrutura tridimensional da PLA2 de C. d. cascavella, iniciamos uma série de caracterizações em solução, especialmente através das técnicas de Dicroísmo Circular e SAXS, devido às dificuldades na cristalização desta proteína antes e após o tratamento com os flavonóides. Na realidade, focamos nossos estudos nos efeitos do tratamento sobre a estrutura da PLA2 com o flavonóide naringina devido, principalmente, às quantidades disponíveis destes compostos. É importante salientar que este tratamento foi realizado por nossos colaboradores seguindo o mesmo protocolo previamente publicado para o flavonóide morina [104]. Neste procedimento, após a incubação da fosfolipase A2 com a naringina, a solução resultante foi carregada em uma coluna cromatográfica de fase reversa que permitiu recuperar o flavonóide utilizado e a PLA2 modificada por sua ação (sPLA2-Nar). Assim, as amostras desta última utilizadas nos experimentos de caracterização estrutural correspondem a PLA2 modificada mas livre do flavonóide utilizado no seu tratamento.

3.1.2 – Objetivos específicos

Realizar a caracterização estrutural em solução, através das técnicas de Dicroísmo Circular e SAXS, da PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* antes e após seu tratamento com o flavonóide naringina, com finalidade

de avaliar os efeitos deste tratamento na estrutura e propriedades enzimática, biológicas e farmacológicas desta fosfolipase. Para alcançar estes objetivos as seguintes etapas foram realizadas:

- Caracterização por Dicroísmo Circular da estrutura secundária desta fosfolipase A2 nativa e após o tratamento com naringina;
- Caracterização da sua estrutura tridimensional por Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos antes e após o tratamento com o flavonóide;
- Modelagem estrutural por homologia para esta PLA2 e predição de sua estrutura secundária;
- Estabelecimento das correlações entre os modelos de SAXS e o tratamento da fosfolipase com a naringina;
- Interpretação dos resultados obtidos com base nas alterações das propriedades bioquímicas observadas por nossos colaboradores.

3.1.3 – Caracterização estrutural em solução

Uma primeira caracterização estrutural em solução foi realizada por Dicroísmo Circular (CD) para a proteína PLA2 de *C. d. cascavella*, nativa (PLA2) e tratada com naringina (PLA2-Nar), em tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4. Nesta condição foi observada uma considerável diminuição do sinal de CD para a proteína após o tratamento com este flavonóide, figura 3.2.

Os resultados de CD indicam que a PLA2, após o tratamento, ainda exibe elementos de estrutura secundária, embora seja evidente a diminuição do sinal correspondente a estes. No caso de fosfolipases A2,



Figura 3.2: Espectros de CD obtidos para a fosfolipase A2 de *Crotalus durissus cascavella* nativa (PLA2) e após o tratamento com naringina (PLA2-Nar). Os espectros foram subtraídos dos respectivos tampões e devidamente normalizados pela concentração das amostras e caminho óptico.

hélices-α são os principais elementos de estrutura secundária, sendo responsáveis pela formação de um motivo estrutural chamado canal hidrofóbico que é ocupado pela cadeia acila do substrato e que contem os resíduos catalíticos [110]. Apesar da modificação do sinal de CD para a proteína após o tratamento com naringina acreditamos que a integridade estrutural desta enzima seja mantida, principalmente pela estabilidade conferida pelo sistema de sete pontes dissulfeto intramoleculares característico de fosfolipases do tipo II [111]. Além disso, é importante ressaltar que a diminuição do sinal de Dicroísmo Circular não decorre da atenuação da intensidade da radiação pela presença de moléculas livres de naringina na solução da proteína porque estas foram removidas por cromatografia após a modificação estrutural da PLA2.

Com objetivo de avaliar o efeito deste flavonóide na estrutura terciária da proteína PLA2, procedemos à sua caracterização por Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos. Após coletarmos os dados de SAXS para esta proteína, antes e após o tratamento com naringina, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron mediante a proposta de pesquisa D11A-SAXS1-5366 (Estudos da influência de flavonóides na dimerização e atividades da PLA2 de *C. d. cascavella* utilizando SAXS), iniciamos seus processamentos. As curvas de espalhamento para a proteína nativa (PLA2) e tratada (PLA2-Nar), com suas funções de distribuição de distâncias associadas, análise de Guinier e *Kratky plot*, são apresentadas na figura 3.3.



Figura 3.3: Dados de SAXS para a proteína PLA2 de *C. d. cascavella* antes do tratamento com a naringina (em azul, ~4 mg/mL) e após o tratamento (em cinza, ~7 mg/mL). a) curvas de espalhamento experimental. b) análise da região de Guinier (*Guinier plot*).



Figura 3.3: Continuação da figura com os dados de SAXS para a PLA2 antes do tratamento com a naringina (em azul, ~4 mg/mL) e após o tratamento (em cinza, ~7 mg/mL). c) gráfico de Kratky (*Kratky plot*) usado na avaliação do estado de enovelamento do sistema. d) função de distribuição de distâncias, p(r).

A análise de Guinier exibe um comportamento linear típico de monodispersidade, como esperado para sistemas sem a formação de agregados, dentro do intervalo de 0,026 Å⁻¹ < q < 0,056 Å⁻¹ em ambos os casos (PLA2 e PLA2-Nar). Os valores de raio de giro (R_g) 23 Å e 24 Å foram calculados através da aproximação de Guinier para a PLA2 e PLA2-Nar, respectivamente. Estes valores também foram obtidos a partir das p(r) calculadas pelo programa *GNOM*: 22 Å para a PLA2 e 23 Å para a PLA2-Nar, que estão em acordo com aqueles derivados do gráfico de Guinier. É importante salientar que os erros destas medidas não foram estimados em decorrência das dificuldades técnicas de fazê-lo para detectores do tipo CCD, como foi o caso do detector MarCCD utilizado na coleta destes dados.

A determinação da massa molecular com a ferramenta *SAXS MoW* indicou que ambas PLA2 e PLA2-Nar comportam-se em solução como dímeros nas concentrações avaliadas, com uma massa molecular média de ~28 kDa, enquanto a massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam* disponível no *Expasy* [112] é 28,9 kDa. Estudos espectroscópicos e de eletroforese para outras fosfolipases de venenos de serpentes têm demonstrado que a configuração dimérica para estas proteínas em solução é um fenômeno comum [113, 114]. Além disso, tanto para a fosfolipase A2 nativa quanto para a tratada com naringina, o *Kratky plot* exibe um máximo característico de proteínas enoveladas e o formato da função de distribuição de distâncias indica que nos dois casos as proteínas apresentam forma prolata.

Os modelos de baixa resolução, recuperados dos dados de espalhamento, apresentaram uma forma alongada, como esperada pelo formato assimétrico da p(r), correspondente a um dímero. Para interpretar tais envelopes, diversos modelos cristalográficos de PLA2s com duas moléculas na ASU foram superpostos, incluindo aqueles formados após aplica-

ção de operações de simetria correspondentes a cada grupo de espaço, gerando diferentes possíveis configurações para estes dímeros. Usando o programa *CRYSOL* para comparar as intensidades do espalhamento experimental e as intensidades computadas para estes modelos, a menor discrepância foi encontrada para o dímero formado pelas cadeias A e E do modelo cristalográfico da agkistrodotoxina, obtida do veneno de *Agkistrodon halys pallas* (código PDB: 1BJJ) [115]. Adicionalmente, análises de interfaces proteicas utilizando o servidor *PISA* (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies service*, http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) [116] sugeriu que o dímero, formado pelas cadeias A e E desta proteína, é estável em solução, apresentando a segunda maior energia de Gibbs de dissociação, $\Delta_{diss}G = 6,7$ kcal/mol, entre todos os arranjos diméricos para as cadeias do modelo cristalográfico desta toxina.

Com finalidade de identificar a possível região de interação e na ausência de cristais, o que inviabilizou a obtenção de modelos cristalográficos, realizamos estudos de modelagem por homologia utilizando o servidor *SWISS-MODEL* (http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL. html) [117] e predição dos elementos de estrutura secundária pela submissão *online* da sequência de aminoácidos da PLA2 de *C. d. cascavella* ao servidor *PSIPRED* (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) [14]. Os elementos de estrutura secundária preditos foram utilizados na interpretação do modelo gerado por homologia e na identificação da possível região de interação do flavonóide. De acordo com os estudos de Dicroísmo Circular e com os resultados da análise de aminoácidos, realizada por nossos colaboradores, para a PLA2 antes e após o tratamento com naringina, análises estas que indicaram que o flavonóide modificou principalmente os resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofanos, fenilalaninas e tirosinas) e histidinas, é provável que a naringina tenha atuado predominantemente na porção do canal hidrofóbico com a maior concentração de diferentes aminoácidos aromáticos e onde estão presentes as duas únicas histidinas da sequência de aminoácidos da PLA2 de *C. d. cascavella*, figura 3.4.

O modelo gerado por homologia através do servidor *SWISS-MODEL* foi construído tendo como base a estrutura cristalográfica da crotoxina B obtida do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (código PDB: 2QOG, cadeia C) [118] que apresenta 90 % de identidade sequencial com a PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* avaliada. De acordo com a predição da estrutura secundária, o modelo de homologia apresenta os mesmos motivos estruturais de outras fosfolipases A2: asa- β (β -wing), canal hidrofóbico (*hydrophobic channel*), alça de Ca²⁺ (Ca²⁺ *binding loop*) e região C-terminal [110], sugerindo ainda que a naringina interagiu com a porção do canal hidrofóbico (mostrada como uma superfície transparente na figura figura 3.4) da PLA2 de *C. d. cascavella*, próxima ao N-terminal e asa- β .

Finalmente, o modelo gerado por homologia no servidor *SWISS-MODEL* foi superposto a cada cadeia polipeptídica do dímero correspondente as cadeias A e E da agkistrodotoxina, com o objetivo de avaliar as possíveis alterações bioquímicas e estruturais provocadas pelo tratamento com naringina. Esta nova configuração dimérica, construída *in silico* para o modelo da PLA2 de *C. d. cascavella*, foi utilizada na interpretação dos modelos de baixa resolução. Os envelopes de SAXS para a PLA2 e PLA2-Nar superposta ao modelo dímerico construído *in silico* são apresentados na figura 3.5.



Figura 3.4: Representação em *cartoon* do modelo de homologia da PLA2 de *C. d. cascavella* e elementos de estrutura secundária (E, folhas- β ; H, hélices- α ; C, regiões desordenadas) preditos pelo servidor *PSIPRED*. Os resíduos de aminoácidos aromáticos e histidinas são apresentados no modelo estrutural (fenilalaninas em rosa, tirosinas em laranja, triptofanos em amarelo e histidinas em vermelho), juntamente com a região com a maior concentração destes diferentes aminoácidos destacada em uma superfície transparente. A figura do modelo gerado por homologia foi preparada usando o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).



Figura 3.5: Modelos de SAXS para a fosfolipase A2 de *Crotalus durissus cascavella* antes (superfície de contorno em azul) e após o tratamento com naringina (superfície de contorno em cinza) superpostos ao modelo dimérico construído *in silico*. Este último é apresentado em *cartoon* incluindo a provável região de interação do flavonóide (Phe em rosa, Tyr em laranja, Trp em amarelo e His em vermelho) em destaque. Estes resíduos de aminoácidos destacados correspondem àqueles identificados como possível sítio de interação da naringina no modelo por homologia. Os envelopes são apresentados em três diferentes orientações para uma melhor visualização. A figura foi preparada usando o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).

Duas configurações principais são reportadas na literatura para modelos cristalográficos de dímeros de fosfolipases A2: uma conformação estendida, mantida por interações entre grupos polares das regiões de hélice- α do N-terminal e da Asa- β de cada monômero, e uma organização dimérica compacta, na qual os canais hidrofóbicos das moléculas estão em contato [119, 120], embora somente a conformação compacta tenha sido observada anteriormente em solução [121]. Os modelos de baixa resolução, obtidos em nossos estudos, apresentam uma nova configuração alongada para dímeros de PLA2s nunca antes observada em solução.

E interessante notar ainda que os envelopes de SAXS para a PLA2-Nar, em cinza, são diferentes dos modelos de baixa resolução para a proteína nativa. Tentativas de interpretar esse dobramento observado no envelope de SAXS para a proteína após o tratamento com naringina foram realizadas por modelagem de corpo rígido, com o programa SASREF [122], e docking flexível, com o programa SITUS [123], porém as duas abordagens não apresentaram resultados melhores que a interpretação destes modelos com a mesma configuração original das cadeias polipeptídicas A e E do modelo cristalográfico da agkistrodotoxina, também utilizada na interpretação do envelope correspondente a PLA2 nativa, conforme apresentado na figura. 3.5. De acordo com estes modelos, o tratamento da PLA2 com o flavonóide induziu mudança conformacional entre as unidades que compõem o dímero em solução, sendo que esta mudança conformacional parece estar diretamente relacionada com a modificação química dos resíduos de aminoácidos aromáticos e histidinas componentes do canal hidrofóbico desta proteína.

Além de conter a maioria dos resíduos de aminoácidos aromáticos e as duas únicas histidinas da fosfolipase A2 de *C. d. cascavella*, o canal hidrofóbico é também a região molecular onde a catálise ocorre. Os resíduos que participam no mecanismo catalítico são amplamente conserva-

dos, His47 e Asp89 na sequência de aminoácidos da PLA2 de *Crotalus durissus cascavella*, sendo a histidina na posição 47 da sequência de aminoácidos um dos prováveis resíduos modificados pela ação da naringina. Deste modo, as modificações químicas e estruturais na região enzimática da fosfolipase A2 estudada devem ser as principais razões da inibição da atividade enzimática desta proteína.

A redução das funções miotóxica, neurotóxica, de agregação plaquetária e bactericida da PLA2 de *C. d. cascavella* parecem estar diretamente relacionadas com a atividade enzimática desta proteína, de modo que as alterações na maquinaria catalítica da PLA2 resultaram na perda das propriedades biológicas e algumas farmacológicas, particularmente na atividade bactericida, dependente da capacidade de degradação de fosfolipídios constituintes da membrana celular, enquanto as outras atividades farmacológicas devem estar relacionadas com a formação de produtos da catálise que atuam como iniciadores de diferentes processos.

Os resultados das caracterizações bioquímicas, estruturais e dos efeitos do tratamento do flavonóide naringina na estrutura da PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* foram organizados na forma de um artigo científico sob título provisório "*Effects of naringin on the structure and pharmacological activities of the neurotoxic sPLA2 from Crotalus durissus cascavella*" que será submetido para publicação em breve.

3.1.4 – Conclusões parciais

Nesta etapa dos trabalhos realizamos a caracterização estrutural, em solução, de uma fosfolipase A2 purificada do veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* através das técnicas de Dicroísmo Circular e SAXS, antes e após o tratamento com o flavonóide naringina. Os modelos de SAXS obtidos apresentaram uma configuração inédita para dímeros de

fosfolipases A2 em solução. Para interpretar tais resultados realizamos estudos de modelagem molecular por homologia e buscas no PDB de modelos cristalográficos diméricos para PLA2s, em diferentes configurações. Estes modelos permitiram identificar o possível sítio de interação da naringina que, provavelmente, induziu uma modificação conformacional no dímero da PLA2 em solução. De acordo com nossos resultados, a modificação química nesta enzima atingiu alguns resíduos do sítio ativo e presentes no canal hidrofóbico desta proteína. A alteração da atividade enzimática parece ser a principal razão para a mudança das atividades farmacológicas e biológica desta interessante macromolécula.

3.2 – PLA2 de Bothrops jararacussu

A toxina BjVIII é uma nova isoforma de PLA2 composta de uma cadeia polipeptídica com 121 aminoácidos (~13,7 kDa) e presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Esta proteína foi extraída da mesma fração cromatográfica do veneno [114] na qual várias isoformas de PLA2, chamadas Bothropstoxina I (Bthtx-I), também foram obtidas [124, 125]. Estas proteínas são conhecidas por Lys49 fosfolipases A2 (Lys49-PLA2) porque apresentam uma lisina na posição 49 da sequência de aminoácidos que, acredita-se, está relacionada com a baixa atividade catalítica observada para esta classe de enzimas. Além de outras hipóteses, a falta de atividade hidrolítica apreciável para estas Lys49-PLA2s tem sido atribuída à presença do grupo amina desta lisina na posição normalmente ocupada pelo cofator Ca²⁺ em fosfolipases A2 enzimaticamente ativas, PLA2s com um ácido aspártico na posição 49 (Asp49-PLA2) [113, 126, 127, 128, 129].

Uma segunda proposição para esta baixa atividade de Lys49-PLA2s diz respeito a uma hidrólise incompleta dos fosfolipídios na qual a falha da liberação dos produtos, com a consequente manutenção de moléculas no

sítio ativo, leva a inibição desta enzima após os primeiros ciclos de catálise [130]. Estudos *in vitro* com estas enzimas purificadas de venenos têm sido criticados pela possível presença de traços de Asp49-PLA2s suficientes para apresentar a atividade enzimática observada [131], de modo que a baixa atividade catalítica de Lys49-PLA2s seria consequência de tal contaminação. No entanto, utilizando proteínas recombinantes onde o risco de contaminação com Asp49-PLA2s é eliminado a hipótese de que Lys49-PLA2s são minimamente ativas parece ser confirmada [131]. A baixa atividade apresentada por estas enzimas é ainda mais enigmática já que ambas Lys49- e Asp49-PLA2s possuem uma maquinaria catalítica altamente conservada, incluindo os importantes resíduos do sítio ativo [113, 126, 127, 132, 133].

3.2.1 – Agregação plaquetária atípica

Mais interessante que qualquer outro aspecto, a toxina BjVIII apresenta uma propriedade de agregação plaquetária completamente única para o grupo de fosfolipases A2 minimamente ativas de venenos de serpentes do gênero Bothrops. Esta enzima é capaz de induzir agregação plaquetária típica de Asp49-PLA2s, por exemplo, Bthtx-II [134]. Esta propriedade incomum de induzir agregação plaquetária por Lys49-PLA2s apresenta novo paradoxo aparente entre atividade catalítica e agregação plaquetária.

Diversos componentes de venenos de serpentes são caracterizados por apresentar propriedades de agregação plaquetária [135, 136], incluindo algumas serino proteases com atividade trombina-*like* [137], alguns componentes não enzimáticos como lectinas tipo C e metaloproteinases/desintegrinas [138]. Fosfolipases A2 são também conhecidas por sua habilidade de gerar lisofosfolipídios bioativos que atuam como fatores

de ativação de agregação plaquetária [139, 140, 141]. Os lisofosfolipídios mediadores de agregação plaquetária mais conhecidos são caracterizados por um esqueleto glicerol ou esfingosina com uma cadeia de ácido graxo e um grupo fosfato: ácido lisofosfatídico (LPA) e esfingosina-1-fosfato (S1P), respectivamente [140]. Estes lisofosfolipídios ativam diversos grupos de receptores acoplados à proteína G (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs) [142] apresentando um impacto particular em funções celulares como ativação de agregação plaquetária, em crescimento de cânceres e metástase, sendo o LPA um dos mais importantes e amplamente estudados fosfolipídios mensageiros [140, 143, 144].

3.2.2 – Objetivos específicos

Realizar a caracterização cristalográfica da toxina BjVIII de *Bothrops jararacussu*, com intuito de investigar as possíveis razões para a propriedade de agregação plaquetária atípica apresentada por esta proteína. Para alcançar estes objetivos as seguintes etapas foram realizadas:

- Cristalização da proteína BjVIII isolada do veneno de B. jararacussu;
- Realização dos experimentos de difração de Raios X para os monocristais obtidos;
- Resolução e refinamento da estrutura da proteína BjVIII para os dados de Cristalografia coletados;
- Identificação das relações entre os modelos estruturais de alta resolução e as atividades apresentadas por esta nova isoforma de PLA2;
- Análises complementares dos modelos que ajudassem no melhor entendimento das funções apresentadas por esta intrigante biomolécula.

3.2.3 – Modelos cristalográficos

Para melhor compreender a propriedade de agregação plaquetária atípica apresentada pela BjVIII e as características estruturais que podem estar relacionadas com esta atividade iniciamos os estudos cristalográficos desta proteína. Após identificar condições iniciais de cristalização através do método da matriz esparsa [38] pequenos cristais foram encontrados na condição número 40 do Crystallization Basic kit (0,1 M citrato de sódio, pH 5.6, 20 % v/v de 2-propanol e 20 % m/v de PEG 4.000) e número 26 do Crystallization Extension kit (0,1 M MES, pH 6,5, 0,2 M de sulfato de amônio e 30 % m/v PEG MME 5.000). Estas condições de cristalização iniciais foram refinadas (grid screens) e permitiram a obtenção de monocristais, apropriados para a coleta de dados, com duas morfologias diferentes. A primeira forma cristalina foi obtida numa solução contendo 0,1 M citrato de sódio, pH 8,5, 20 % v/v de 2-propanol e 18 % m/v PEG 4.000, enguanto a segunda numa solução formada por 0,1 de MES, pH 8,0, 0,2 M sulfato de amônio e 28 % m/v de PEG MME 5.000. Os cristais em ambas soluções cresceram em aproximadamente duas semanas e, após caracterização cristalográfica inicial, foram identificados como pertencentes a dois grupos de espaço distintos: um ortorrômbico $(P2_12_12_1)$ e outro trigonal ($P3_121$), figura 3.6.

De posse dos monocristais obtidos, dados de difração de Raios X foram adquiridos no LNLS mediante a proposta de pesquisa D03B-MX1-6352 (Coleta de dados de cristais de Bthtx-I nativa e tratada com cumarina hidrofílica), após estabelecer uma condição de crioproteção para a solução em que os cristais foram formados. Às soluções de cristalização dos cristais de BjVIII foi adicionado 20 % de etilenoglicol como agente crioprotetor. Os dados de difração foram coletados usando uma faixa de oscilação de 1° e 0,4° para os cristais que foram em seguida caracterizados


Figura 3.6: Cristais típicos da proteína BjVIII obtidos usando o método da gota suspensa. a) cristal correspondente ao grupo de espaço $P2_12_12_1$. b) forma cristalina correspondente ao grupo de espaço $P3_121$. As imagens foram adquiridas utilizando luz polarizada.

como pertencentes aos grupos de espaço $P2_12_12_1$ (a = 48,4 Å, b = 65,3 Å e c = 84,3 Å) e $P3_121$ (a = b = 55,7 Å e c = 127,9 Å), respectivamente, figura 3.7.

Os dois conjuntos coletados apresentaram boas estatísticas como resultado do processo de redução de dados. A completeza, fração dos dados coletados em relação ao total esperado teoricamente, e a multiplicidade, número de vezes que uma reflexão foi medida, obtidas para os dois conjuntos de dados foram satisfatórias. As razões intensidade/erro obtidas, $I/\sigma(I)$, apresentaram valores maiores que o valor típico de ~2 usado na definição da resolução máxima de um conjunto de dados, mesmo para a faixa de maior resolução. Os valores de R_{merge} obtidos também estão dentro das faixas de valores típicos para dados de proteínas, entre ~2 % e 35 %. Através da análise do coeficiente de Matthews [145] foi possível identificar duas moléculas como conteúdo da unidade assimétrica para ambas formas cristalinas.



Figura 3.7: Imagens de difração dos cristais de BjVIII. a) imagem adquirida com 1° de oscilação e círculos de resolução desenhados em 2,0 Å, 2,7 Å, 4,0 Å, 8,0 Å para o cristal pertencente ao grupo de espaço $P2_12_12_1$. b) imagem adquirida com 0,4° de oscilação e círculos de resolução desenhados em 1,9 Å, 2,5 Å, 3,7 Å e 7,4 Å para o cristal pertencente ao grupo de espaço $P3_121$. Uma expansão da região de maior resolução, incluindo os pontos de difração (*spots*) com seus respectivos índices *hkl*, também é apresentada.

3.2 PLA2 de Bothrops jararacussu

As estruturas da BjVIII nos dois grupos de espaço foram encontradas por substituição molecular com o programa *AMoRe* utilizando como modelo de busca a estrutura cristalográfica resolvida a 2,2 Å de resolução da proteína BnSP-7 de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (código PDB: 1PA0) [146]. Esta proteína possui uma identidade sequencial de 98 % e uma similaridade de 99 % com a sequência de aminoácidos da BjVIII. Esta caracterização preliminar foi devidamente publicada no artigo científico intitulado "*Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from B. Jararacussu*" [114].

Após o refinamento estrutural, os modelos finais para cada grupo de espaço consistem de duas moléculas de BjVIII formando homodímeros com aproximadamente 300 moléculas de água cada. O refinamento convergiu para valores de R_{factor} iguais a 19,7 % e 17,3 % ($R_{free} = 26,5$ % e 23,8 %) para 19.790 e 18.090 reflexões, numa região de resolução de 45,16-1,83 Å e 38,91-1,98 Å, para os modelos nos grupos de espaço $P3_121$ e $P2_12_12_1$, respectivamente, tabela 3.1.

Após o refinamento das estruturas mencionadas, os modelos finais apresentam boa estereoquímica geral com pequenos valores de RMSD (desvio quadrático médio residual) para comprimentos e ângulos de ligação, e um valor de B-fator médio da ordem de 20. Estes valores de B-fator correspondem aos fatores de temperatura residuais que serão depositados dessa forma, incluindo os tensores de cada grupo de TLS definido no refinamento, para os modelos da BjVIII e demais proteínas caracterizadas nesta tese.

A sequência de aminoácidos da BjVIII determinada por nossos colaboradores foi modificada após interpretação dos mapas de densidade eletrônica ($2F_{o}$ - F_{c} e F_{o} - F_{c}) durante o estágio de refinamento estrutural. As posições 36 e 55 na sequência de aminoácidos da BjVIII foi inicialmente identificada como glicina e valina, respectivamente, mas após diversos ci-

Forma cristalina	Ortorrômbica	Trigonal
Estatísticas da coleta de dados		
λ (Å)	1,425	1,425
Grupo de espaço	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P3_{1}21$
Parâmetros de cela unitária		
a (Å)	48,4	55,7
b (Å)	65,3	55,7
<i>c</i> (Å)	84,3	127,9
Região de resolução (Å)	38,91-1,98 (2,10-1,98)	45,16-1,83 (2,00-1,83)
N° de reflexões únicas	19.116 (2.226)	20.906 (2.525)
Completeza (%)	96,5 (78,6)	97,2 (81,8)
Multiplicidade	7,2 (6,5)	5,0 (4,6)
$I/\sigma(I)$	20,0 (4,6)	22,5 (6,4)
R_{merge} (%)	7,9 (35,4)	4,9 (17,7)
V_M (Å 3 Da $^{-1}$)	2.44	2.10
Conteúdo de solvente (%)	49,69	41,53
Estatísticas do refinamento		
N° de reflexões no refinamento	18.090	19.790
R _{factor} (%)	17,3	19,7
${\it R}_{free}$ (%)	23,8	26,5
N° de moléculas de solvente	276	317
Fator de temperatura médio	20,6	22,4
RMSD para comprimentos de ligação (Å)	0,022	0,023
RMSD para ângulos de ligação (°)	2,278	2,208
Gráfico de Ramachandran		
Regiões mais favorecidas (%)	98,5	99,5
Regiões adicionalmente permitidas (%)	1,5	0,5
Outiliers (%)	0,0	0,0

Tabela 3.1: Estatísticas dos processamentos dos dados de difração da BjVIII.

Os valores em parênteses referem-se à última camada de resolução. O valor de R_{free} foi calculado para 5 % das reflexões que não foram incluídas no refinamento.

clos de refinamento foi observada a presença inequívoca de uma serina na posição 36 (Ser36) e uma leucina na posição 55 (Leu55). A estrutura primária da BjVIII é muito parecida com as outras diferentes isoformas de Bthtx-I, variando de 97 % a 99 % em termos de identidade sequencial, sendo a mutação Lys36 para Ser36 na BjVIII aquela mais marcante entre as diversas isoformas de Bthtx-I. Superposições estruturais entre as quatro cadeias da BjVIII e os diferentes modelos de Bthtx-I com enfoque nesta mutação específica não adicionaram nenhuma informação substancial que tornasse possível o entendimento da propriedade de agregação plaquetária apresentada por esta nova Lys49-PLA2.

Um interessante padrão de moléculas de água mostrando uma distribuição pentagonal altamente organizada foi observada envolvendo a região externa do canal hidrofóbico dos modelos finais da BjVIII, figura 3.8. A razão mais provável para tais formações é a ocorrência de núcleos de gelo cristalino [147] através da formação de um sistema de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os resíduos de aminoácidos numa região da superfície proteica relativamente plana. Interessantemente este fenômeno já foi demonstrado numa superfície altamente plana de cobre (110) [148]. O mesmo comportamento também foi observado numa região hidrofóbica na proteína crambina, onde foi sugerido que tais moléculas de água neste arranjo pentagonal estão relacionadas com o processo de enovelamento desta proteína [149].

3.2.4 – Fator de agregação plaquetária inesperado no sítio ativo

A densidade eletrônica nos mapas de Fourier $2F_{o}$ - F_{c} é continua e bem definida para ambos monômeros na ASU dos dois grupos de espaço estudados. Para nossa surpresa, identificamos uma densidade eletrônica



Figura 3.8: a) Moléculas de água pentagonalmente arranjadas no modelo cristalográfico da BjVIII no grupo de espaço $P3_121$. b) $P2_12_12_1$. c) Diagrama em estéreo das moléculas encontradas na porção externa do canal hidrofóbico da BjVIII (cadeia B) no grupo de espaço $P2_12_12_1$. O diagrama foi preparado com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org). Os valores apresentados para as distâncias estão em angstroms.

3.2 PLA2 de Bothrops jararacussu

não esperada próxima aos resíduos que compõem o sítio ativo da BjVIII em ambas as formas cristalinas, que foi modelada como um lisofosfolipídio baseando nos possíveis produtos da reação enzimática e nos efeitos observados para esta nova isoforma de Lys49-PLA2, figura 3.9.



Figura 3.9: Representação em estéreo dos mapas de densidade eletrônica $2F_{o}$ - F_{c} (1,0 σ , em azul) e F_{o} - F_{c} (3,0 σ , em vermelho) incluindo a molécula de ácido lisofosfatídico modelada (código PDB para ligantes: HHG) e resíduos de aminoácidos 3,0 Å ao redor deste lisofosfolipídio correspondentes à cadeia B da BjVIII no grupo de espaço $P3_{1}21$. As moléculas de água foram omitidas para uma melhor clareza. A figura foi preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).

O aparecimento de densidades eletrônicas não esperadas em modelos cristalográficos de PLA2s não é fenômeno incomum. Em outras estruturas cristalográficas densidades similares foram interpretadas como moléculas de ácidos graxos provavelmente advindas de um processo ineficiente de liberação dos produtos da catálise [130, 131], sendo atribuído a estas espécies o efeito de inibidores enzimáticos, o que explicaria a baixa atividade catalítica observada para Lys49-PLA2s. No entanto, nossos dados apresentam pela primeira vez um lisofosfolípideo ligado a uma PLA2.

Além de apresentar esta densidade eletrônica interpretada como uma molécula de ácido lisofosfatídico, duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B) e diversos ligantes utilizados como componentes das soluções de cristalização (íons sulfato, íons citrato, etilenoglicol e 2-propanol) foram modelados nas estruturas finais, figura 3.10.

Os modelos cristalográficos da BjVIII obtidos após o refinamento estrutural apresentam as mesmas características observadas para outras PLA2s: um N-terminal de hélice- α (α 1), um segmento relativamente longo na forma de uma alça correspondente ao sítio de ligação de cálcio (alça de Ca²⁺), um par de hélices- α paralelas relativamente longas (α 2 e α 3) que junto com a α 1 compõem o canal hidrofóbico, e uma asa- β formada por duas fitas antiparalelas [126, 110]. Todos estes elementos estão amarrados num sistema de sete pontes dissulfeto intramoleculares [111]. A superposição estrutural utilizando o servidor *SuperPose* (http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/) [150] de cada uma das quatro cadeias polipeptídicas modeladas juntamente com as moléculas do lisofosfolipídio apresentou pequena diferença estrutural para algumas porções das cadeias proteicas e conformações alternativas para o ligante, figura 3.11.

As maiores diferenças entre as posições dos C α foram observadas para os segmentos compostos pelos resíduos de aminoácidos 30-31 (Alça de Ca²⁺), 76-78 (*loop*) e 108-114 (C-terminal). Comparando os fatores de temperatura médio para estes segmentos, 27,3 e 26,5 nos grupos de espaço $P3_121$ and $P2_12_12_1$, respectivamente, com aqueles para a cadeia polipeptídica completa, 22,4 e 20,6 nos mesmos grupos de espaço, a variação estrutural observada parece ser predominantemente consequência da maior flexibilidade destas regiões. No entanto, análises do empaco-



Figura 3.10: Conteúdos das ASUs dos modelos cristalográficos obtidos para a proteína BjVIII. a) ASU da BjVIII no grupo de espaço $P3_121$ apresentando as moléculas do ácido lisofosfatídico (HHG^C e HHG^D) e íons sulfato (SO4^E) provenientes do tampão de cristalização. b) conteúdo da ASU no grupo de espaço $P2_12_12_1$ apresentando além das moléculas do ácido lisofosfatídico, moléculas de isopropanol (IPA^E e IPA^F), íons citrato (FLC^G e FLC^H) e molécula de etilenoglicol (EDO^I) provenientes do tampão de cristalização. As respectivas cadeias dos ligantes são apresentadas sobrescritas aos códigos de três letras. Os elementos de estrutura secundária dos modelos são apresentados em diferentes cores: hélices- α (vermelho), folhas- β (amarelo) e *loops* (verde). A figura foi preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).



Figura 3.11: Superposição estrutural dos modelos cristalográficos da BjVIII. a) superposição de cada uma das quatro cadeias da BjVIII nos dois diferentes grupos de espaço e moléculas de lisofosfolipídios. Os motivos estruturais também são apresentados: Asa- β e Alça de Ca²⁺. Regiões estruturais com valores de RMSD \geq 1,0 entre os carbonos alfa (C α) das diferentes cadeias estão destacados em cinza. A figura foi preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org) usando um esquema de cores para estrutura secundária: hélices- α (vermelho), folhas- β (amarelo) e *loops* (verde). b) Gráfico do desvio quadrático médio por número do resíduo calculado pelo servidor *SuperPose* para as quatro cadeias proteicas.

tamento cristalino mostraram que o deslocamento mais pronunciado observado para os resíduos 108-114 é consequência de uma orientação especial dos resíduos His111 e Leu112 da cadeia B da BjVIII no grupo de espaço *P*3₁21, figura 3.12.

De acordo com estas análises fica claro que as diferenças mais pronunciadas entre os modelos cristalográficos da BjVIII são consequência do empacotamento cristalino e da flexibilidade de algumas regiões da cadeia polipeptídica. Alguns pesquisadores têm atribuído tais variações no C-terminal como a provável razão para algumas das diversas propriedades farmacológicas observadas para PLA2s [151, 152, 153], o que não parece ser o caso da proteína BjVIII avaliada em nossos trabalhos.

Uma caracterização bioquímica extensiva da propriedade de agregação plaquetária apresentada pela toxina BjVIII já foi publicada [114]. Neste trabalho foi demonstrado que de forma similar a outras Lys49-PLA2s, tais como Prtx-I, Prtx-II [154] e Bthtx-I [155], a proteína BjVIII não apresenta uma atividade enzimática significativa, porém, ao mesmo tempo, somente a BjVIII apresenta atividade de agregação plaquetária típica de fosfolipases enzimaticamente ativas, Asp49-PLA2s, como a toxina Bthtx-II [134]. Seguindo este raciocínio foi especulado em nosso primeiro trabalho que a existência de regiões moleculares, diferentes do sítio ativo, seriam responsáveis, pelo menos parcialmente, por esta atividade farmacológica atípica para Lys49-PLA2s. No entanto, após a obtenção dos modelos finais para a BjVIII tornou-se evidente que a presença da molécula de lisofosfolipídio na região do sítio ativo deve ser a principal razão para esta propriedade, ao invés das pequenas variações estruturais observadas nos modelos da BjVIII e das mutações entre esta e as outras isoformas de Bthtx-I.

A molécula de lisofosfolipídio modelada no sítio ativo da toxina BjVIII foi identificada por comparação visual através de várias buscas por ligantes nos servidores *Hic-Up* [156, 157, 158] (http://xray.bmc.uu.se/hicup/)



Figura 3.12: Representação do empacotamento cristalino da BjVIII no grupo de espaço $P3_121$ mostrando uma molécula gerada por simetria (em cinza) que estabiliza uma conformação alternativa de parte do C-terminal da cadeia B, principalmente através de interações hidrofóbicas entre os resíduos His111 e Leu112 com os resíduos do canal hidrofóbico da molécula simétrica. A figura foi preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org) usando um esquema de cores para estrutura secundária aplicada à ASU da BjVIII no grupo de espaço $P3_121$: hélices- α (vermelho), folhas- β (amarelo) e *loops* (verde). Esta unidade assimétrica é a mesma apresentada na figura 3.10 a), porém numa outra orientação para falicilitar a visualização da interação dos resíduos His111 e Leu112 com a molécula simétrica (em cinza).

3.2 PLA2 de Bothrops jararacussu

e *Ligand Expo* [159] (http://ligand-expo.rcsb.org/). A densidade eletrônica contínua observada no canal hidrofóbico foi melhor interpretada como uma molécula do ácido lisofosfatídico 1-monohexanoil-2-hidroxi-*sn*glicero-3-fosfato (código PDB para ligantes: HHG). Porém após uma série de ciclos de refinamento observou-se que este ligante apresenta uma ocupância de 80 % para cada cadeia polipeptídica de cada forma cristalina. A escolha desta molécula de LPA foi feita baseando na melhor interpretação dos mapas de densidade eletrônica, implicações bioquímicas e interações proteína-ligante estabelecidas, figura 3.13.

Produtos da catálise de fosfolipídios por PLA2s, como ácido aracdônico e lisofosfolipídios, são conhecidos ativadores de agregação plaquetária [134, 139, 140, 141, 160]. Desse modo, considerando estas possibilidades e a interpretação da densidade eletrônica inesperada, acreditamos que a propriedade de agregação plaquetária atípica apresentada pela BjVIII advém da liberação do ácido lisofosfatídico ocluso no sítio ativo como consequência de uma falha na sua liberação. Além das interações hidrofóbicas entre a porção acila do LPA e resíduos de aminoácidos do canal hidrofóbico da BjVIII, as ligações de hidrogênio que estabilizam o grupo fosfato e o esqueleto de glicerol devem ser rompidas no processo de liberação desta molécula. Uma possibilidade é que mudanças conformacionais na enzima em solução, consequentes do meio, permitam essa liberação.

Os resultados da obtenção dos modelos cristalográficos da BjVIII incluindo suas correlações com a atividade farmacológica observada foram organizados na forma de um artigo científico sob título provisório "*Crystallography and bioinformatics in the study of platelet aggregation and the enzymatic and myotoxic activities of BjVIII: a new PLA2 Bthtx-I-like isoform*" que será submetido para publicação brevemente.



Figura 3.13: Diagrama esquemático do sítio ativo apresentando as ligações de hidrogênio que estabilizam a molécula de lisofosfolipídio no canal hidrofóbico da BjVIII no grupo de espaço $P3_121$. a) cadeia B. b) cadeia A. A representação diagramática foi preparada baseando-se nas interações identificadas pelo servidor *PISA*.

3.2.5 – Conclusões parciais

A nova isoforma de Lys49-PLA2 isolada do veneno de Bothrops *jararacussu* e nomeada BjVIII foi cristalizada em duas formas cristalinas diferentes. Dados de difração de Raios X foram coletados para os monocristais obtidos permitindo a resolução da estrutura desta toxina em dois diferentes grupos de espaço. Os modelos cristalográficos finais apresentaram estatísticas adequadas e as principais características estruturais comuns a outras fosfolipases A2. Um interessante padrão de moléculas de água pentagonalmente organizadas foi observado na superfície externa do canal hidrofóbico de cada uma das cadeias polipeptídicas modelas. Pequenas variações estruturais foram observadas para os resíduos de aminoácidos, porém não revelaram as razões para a propriedade de agregação plaquetária atípica observada para a BjVIII. Na realidade, a existência de uma densidade eletrônica não esperada no sítio ativo desta enzima interpretada como uma molécula de ácido lisofosfatídico é a explicação mais provável para esta atividade farmacológica. A partir de nossos estudos e de outros pesquisadores parece que a ancoragem-liberação de produtos da catálise, e possivelmente de outros componentes químicos presentes no veneno de serpentes, constitui um possível mecanismo auxiliar no exercício da ampla gama de funções farmacológicas apresentadas por estas intrigantes biomoléculas atuando como carregadores moleculares.

3.3 – PLA2 de Crotalus durissus terrificus

Nos últimos anos alguns de nossos colaboradores isolaram três isoformas de PLA2 a partir do veneno de uma outra serpente crotálica chamada *Crotalus durissus terrificus*. Essas isoformas foram denominadas F15, F16 e F17 [161, 162]. Apesar de estar presente no mesmo veneno, a isoforma F17 exibe características diversas das outras duas, tais como elevada atividade bactericida e efeitos anticoagulantes [161]. Estudos cristalográficos com estas três isoformas foram iniciados com o intuito de investigar as características estruturais que podem conferir propriedades diferentes para estas PLA2s; porém, estes estudos não avançaram para as isoformas F15 e F16 devido às dificuldades na cristalização destas duas.

3.3.1 – Objetivos específicos

Realizar a caracterização cristalográfica das isoformas F15, F16 e F17 da serpente *Crotalus durissus terrificus*, visando identificar as possíveis razões estruturais para as diferentes funções apresentadas por estas proteínas presentes no mesmo veneno. Na tentativa de alcançar estes objetivos as seguintes etapas foram realizadas:

- Ensaios de cristalização das proteínas F15, F16 e F17 isoladas do veneno de *C. d. terrificus*;
- Realização dos experimentos de difração de Raios X para os monocristais obtidos;
- Realização dos processamentos para os dados de Cristalografia coletados.

3.3.2 – Caracterização cristalográfica preliminar

Diversos ensaios de cristalização foram realizados para as isoformas F15, F16 e F17 purificadas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizando *kits* de cristalização apropriados (*Crystallization Basic kit* e *Crystal*-

3.3 PLA2 de Crotalus durissus terrificus

lization Extension kit). Indícios de cristais para a proteína F17 foram encontrados na condição número 35 do *Crystallization Extension kit* formada por 0,1 M HEPES, pH 7,5 e 70 % v/v 2-metil-2,4-pentanediol (MPD); porém, não foram observadas formações cristalinas para as isoformas F15 e F16, mesmo após experimentos de cristalização em diferentes temperaturas e concentrações das proteínas. Deste modo, demos prosseguimento apenas aos estudos cristalográficos com a enzima F17.

Após realizar o refinamento da condição de cristalização inicial pela variação do pH do tampão e das quantidades de MPD, monocristais para a isoforma F17 foram obtidos numa solução de HEPES 0,1 M, pH 8,2 e 62 % de MPD, figura 3.14.



Figura 3.14: Cristal típico de F17 obtido após os refinamentos das condições de cristalização. A imagem foi adquirida utilizando luz polarizada.

Os experimentos de difração de Raios X para o cristal de F17 foram realizados no LNLS mediante as propostas de pesquisa D03B-MX1-6101 (Estudos cristalográficos da isoforma F17 de *C. d. terrificus*) e D03B-MX1-6347 (Coleta de dados de cristais da isoforma F17 de *C. d. terrificus*). Como a solução de cristalização já continha 62 % de MPD, substância

3.3 PLA2 de Crotalus durissus terrificus

que atua como crioprotetor nesta quantidade, não foi necessária a adição de nenhum outro reagente para crioproteção dos cristais; assim, o cristal selecionado foi retirado da solução mãe e exposto diretamente ao feixe de Raios X sob fluxo de nitrogênio gasoso. Um conjunto de dados com 139 imagens foi coletado utilizando uma varredura de 1° de oscilação. O padrão de difração correspondente ao cristal de F17 é apresentado na figura 3.15.



Figura 3.15: Padrão de difração da proteína F17 com círculos de resolução desenhados em 10,4 Å, 5,2 Å, 3,5 Å e 2,6 Å. Também é apresentada uma expansão da região de maior resolução incluindo os índices *hkl* dos *spots* de difração.

Durante o processamento dos dados, na etapa de indexação, verificamos uma série de possibilidades de grupos de espaço prováveis. Este conjunto de possibilidades foi reduzido avaliando as condições de reflexão para cada possibilidade e as reflexões observadas para o conjunto de dados. Empregando o programa *POINTLESS* [59] o grupo de espaço mais provável foi determinado como sendo $P3_121$ com parâmetros de rede a = b = 64,1 Å e c = 95,2 Å.

3.3 PLA2 de Crotalus durissus terrificus

A análise do coeficiente de Matthews [145] sugeriu uma ambiguidade de número de cópias de F17 como conteúdo da ASU (1 molécula/ASU: $V_M = 3,89 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ e 68,39 % de solvente ou 2 moléculas/ASU: $V_M =$ 1,94 Å³ Da⁻¹ e 36,79 % de solvente). Uma forma de resolver esta ambiguidade é através da utilização de funções de auto-rotação que são obtidas pela rotação de funções de Patterson até que a função original e a resultante atinjam uma coincidência máxima [163]. As funções de Patterson são particularmente interessantes porque podem ser calculadas sem informação de fases, utilizando apenas as intensidades obtidas no experimento de difração. Essas funções são visualizadas em termos de mapas com picos correspondentes aos vetores interatômicos na estrutura do cristal [164].

Na construção dos mapas de auto-rotação é necessário, inicialmente, definir a orientação do sistema em termos de um eixo de rotação e de ângulos sobre este eixo. Este sistema de eixos e ângulos pode ser definido por diferentes convenções, sendo a descrição em termos de ângulos polares (κ , $\omega e \phi$) uma das mais úteis pela facilidade de visualização das rotações existentes através de uma projeção estereográfica dos máximos da função de auto-rotação em seções para diferentes valores do ângulo κ [165]. Uma outra convenção particularmente importante para o cálculo da chamada função de rotação rápida [166] é a descrição em termos de ângulos de Euler (α , $\beta e \gamma$).

Para a solução da ambiguidade do número de moléculas que compõem a ASU do cristal de F17 funções de auto-rotação foram calculadas utilizando o programa *POLARRFN* [88] que permitiu a identificação, além dos picos relacionados aos eixos cristalográficos do grupo de espaço $P3_121$, de picos correspondentes aos eixos de rotação de ordem 2 (seção $\kappa = 180^\circ$) que relacionam duas moléculas da ASU através de uma simetria não-cristalográfica (noncrystallographic symmetry, NCS), figura 3.16.



Figura 3.16: Representação gráfica das funções de auto-rotação calculadas pelo programa *POLARRFN*. a) seção $\kappa = 120^{\circ}$ com pico correspondente ao eixo cristalográfico de ordem 3. b) seção $\kappa = 180^{\circ}$ com picos correspondentes aos eixos cristalográficos de ordem 2 e eixos de simetria não cristalográfica (*noncrystallographic symmetry*, NCS) que relacionam as duas moléculas conteúdo da ASU. As funções de auto-rotação foram calculadas usando os dados na região de 15 Å a 4 Å e raio de integração de 30 Å.

Nas duas seções da função de auto-rotação apresentadas, os picos mais intensos (100 %) são gerados pelos eixos cristalográficos. O pico na seção $\kappa = 120^{\circ}$ com coordenadas polares $\omega = 0^{\circ}$ e $\phi = 0^{\circ}$ corresponde ao eixo cristalográfico de ordem 3, enquanto na seção $\kappa = 180^{\circ}$ os picos $(\omega,\phi) = (90^{\circ},0^{\circ}), (90^{\circ},60^{\circ})$ e $(90^{\circ},120^{\circ})$ representam os três eixos cristalográficos de ordem 2. Os picos correspondentes aos eixos de simetria não-cristalográfica de ordem 2, indicativos da presença de duas moléculas de F17 na ASU do cristal, apresentaram valores iguais a 64 % da origem e foram observados na seção $\kappa = 180^{\circ}$ com coordenadas polares $(\omega,\phi) = (90^{\circ},30^{\circ}), (90^{\circ},90^{\circ})$ e $(90^{\circ},150^{\circ})$.

Os principais resultados do processo de redução dos dados cristalográficos da F17, suas estatísticas e parâmetros da coleta de dados são apresentados na tabela 3.2.

Uma solução preliminar para a estrutura da F17 foi encontrada através do método de substituição molecular, utilizando o procedimento automático implementado no programa MrBUMP. Os programas FASTA [167] e PROBCONS [168] foram utilizados na localização do modelo de busca, o programa MOLREP [94] para a substituição molecular e o programa REFMAC5 [78] para a avaliação das possíveis soluções e cálculo das fases iniciais. O melhor modelo de busca foi preparado pelo programa CHAINSAW [169] utilizando o 1º colocado (código PDB: 1BJJ, cadeia F) [115] na pesquisa de alinhamento sequencial, esse modelo apresenta uma identidade sequencial de 76 % e o mesmo tamanho da F17 (122 aminoácidos). Após 30 ciclos de refinamento realizados na avaliação da solução de substituição molecular para um modelo de polialanina os valores de R_{factor} e R_{free} obtidos foram 42.4 % and 48.9 %, respectivamente. As duas cadeias polipeptídicas, conteúdo da ASU do cristal de F17, apresentam uma configuração similar àquela observada para outras fosfolipases A2, em particular à proteína BjVIII também caracterizada nesta tese.

Forma cristalina	Trigonal
λ (Å)	1,425
Grupo de espaço	$P3_{1}21$
Parâmetros de cela unitária	
a (Å)	64,1
b (Å)	64,1
c (Å)	95,1
Região de resolução (Å)	95,35-2,95 (3,11-2,95)
N° de reflexões únicas	5.083 (724)
Completeza (%)	99,9 (100,0)
Multiplicidade	7,7 (8,0)
$I/\sigma(I)$	23,3 (4,5)
R_{merge} (%)	6,7 (44,6)
V_M (Å 3 Da $^{-1}$)	1,94
Conteúdo de solvente (%)	36,79

Tabela 3.2: Parâmetros do cristal de F17 e estatísticas dos processamentos.

Os valores em parênteses referem-se à última camada de resolução.

Além disso, mapas de auto-rotação foram avaliados para os fatores de estrutura calculados a partir do modelo de coordenadas atômicas da F17 obtido como solução, apresentando os mesmos picos de NCS observados nos mapas gerados para os fatores de estrutura experimentais.

Embora esta solução preliminar tenha sido obtida, os dados cristalográficos apresentam uma razoável anisotropia, a qual tem dificultado o refinamento estrutural. Além disso, é importante ressaltar que tanto a solução estrutural quanto as funções de auto-rotação foram obtidas para o conjunto de dados indexado no grupo de espaço $P3_121$ e, como não foi possível avançar com o refinamento estrutural, não podemos descartar a possibilidade do grupo de espaço estar definido incorretamente. Porém, ao mesmo tempo, realizamos diversas tentativas de faseamento com os dados em outros grupos de espaço possíveis para os quais também não foi obtida nenhuma outra solução até o presente momento.

3.3.3 – Conclusões parciais

Três isoformas isoladas do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* foram submetidas a ensaios de cristalização, resultando na obtenção de monocristais somente para a proteína F17. Estes cristais difrataram a uma resolução máxima de 2,95 Å, porém os dados apresentaram uma considerável anisotropia. Mesmo com esta e outras dificuldades, durante o processamento dos dados foi possível obter uma solução preliminar da estrutura desta proteína no grupo de espaço $P3_121$ para duas moléculas como conteúdo da ASU. Devido às dificuldades encontradas durante o refinamento estrutural, acreditamos que a identificação de novas condições de cristalização seja a melhor saída para a obtenção de um modelo estrutural da F17 que possa ser devidamente validado e útil ao entendimento de suas funções diferenciadas.

Capítulo 4

Aldose Redutases de semente de milho

Aldose redutases (ARs, EC 1.1.1.21) têm sido extensivamente estudadas em humanos e em modelos animais [170], principalmente devido à sua relação com o desenvolvimento de complicações diabéticas, como nefropatias, neuropatias e retinopatias [171, 172]. Estas complicações surgem devido às elevadas quantidades de glicose acumuladas que são resultantes de hiperglicemias. Esta glicose em excesso é convertida em sorbitol pelas ARs de mamíferos, afetando a retina, nervos periféricos e os rins, por ser o sorbitol extremamente tóxico às células destes tecidos [173, 174]. Na tentativa de minimizar estas complicações, diversos inibidores de aldose redutases vêm sendo estudados; no entanto, devido à elevada ocorrência de efeitos colaterais, muitos candidatos a fármacos não são aprovados [175, 176].

Diferentemente das ARs encontradas em tecidos humanos, acreditase que a presença de uma aldose redutase no endosperma e outra identificada no embrião em determinados estágios do desenvolvimento da semente de milho, figura 4.1, esteja relacionada com o metabolismo de sorbitol [177].



Figura 4.1: Representação esquemática de uma semente de milho com indicações para o endosperma e embrião.

A enzima aldose redutase de semente de milho é uma proteína membro da superfamília aldo-ceto redutase (*aldo-keto reductase*, AKR), que é formada por proteínas monoméricas (~35 kDa) do tipo (α/β)₈-barril e que, em geral, usam NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida) como cofator enzimático para catalisar a redução de glicose e outros açúcares aos seus respectivos álcoois derivados [178], numa reação que envolve a transferência de um íon hidreto do carbono C4 do NADPH, que se converte a NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada), e a doação de um próton de um dos resíduos de aminoácidos da enzima [179].

4.1 – Metabolismo de sorbitol e detoxificação

Além de catalisar inúmeras reações de redução de compostos carbonílicos aos seus correspondentes álcoois, aldose redutases também atuam como catalisadores em reações reversas de oxidação, como é o caso das ARs de semente de milho. Em experimentos *in vitro* foi verificado a inexistência de atividade catalítica para conversão de glicose em sorbitol, atividade esta extremamente importante para ARs humanas; no entanto, a reação reversa de oxidação de sorbitol à glicose foi observada para a AR de semente de milho [177]. Como as sementes de milho não acumulam sorbitol em grandes quantidades [180], tem sido sugerido que o sorbitol pode ser um intermediário na biossíntese de amido quando ARs estão presentes catalisando a conversão de sorbitol para glicose [181].

A especificidade de substratos é determinada por regiões altamente flexíveis (*loops*) presentes na cavidade de abertura do $(\alpha/\beta)_8$ -barril [182]. Devido à elevada plasticidade desta região, uma série de substratos, entre eles aldeídos, cetonas, monossacarídeos, cetoesteróides e prostaglandinas [178], são convertidos pela ação catalítica de ARs. A ampla gama de substratos para diversas ARs torna difícil atribuir função específica a estas enzimas nos diferentes tecidos e organismos. Em alguns casos, essa capacidade de catalisar a conversão de múltiplos substratos é associada ao alívio do estresse químico (detoxificação) provocado pela presença destas espécies [183, 184]. A diminuição do estresse osmótico também tem sido associada à ação de algumas aldose redutases que metabolizam açúcar [185].

Também são reportados estudos em que estas enzimas atuam em processos metabólicos não associados a situações de estresse, como no caso do metabolismo de hormônios esteróides [186] e prostaglandinas [187], em processos associados a diversas funções celulares vitais em

4.2 AR do endosperma

mamíferos, incluindo proliferação e diferenciação celulares [188]. No entanto, o fator chave para a preferência por determinado substrato parece estar mais provavelmente relacionado com as condições do meio onde estas enzimas são expressas e que substratos estão em contato com as mesmas [189].

4.2 – AR do endosperma

Recentemente, as propriedades enzimáticas da proteína recombinante AR do endosperma da semente de milho (AKR4C7) foram investigadas com objetivo de identificar seus possíveis alvos químicos e prováveis funções celulares [177]. Neste trabalho foi verificado que, além de exibir atividade típica de aldo-ceto redutases, catalisando a redução do substrato padrão para esta classe de enzimas, DL-gliceraldeído, AKR4C7 também é capaz de oxidar o D-sorbitol a D-glicose na presença de NADP⁺; porém, não foi verificada atividade catalítica apreciável para a redução de D-glicose a D-sorbitol utilizando o cofator enzimático NADPH, apesar de ter sido observada uma acentuada atividade para outros açúcares e álcoois, entre eles, D-xilitol, D-ribose, D-xilose e D-arabinose. Esta característica constitui a primeira observação de uma provável atuação de ARs no metabolismo de sorbitol.

Os valores da constante enzimática de Michaelis-Menten (K_m) observados para a atividade da AKR4C7 frente ao sorbitol foram altos (valores em mM), mas similares aos valores de K_m da atividade da AR humana frente à glicose (> 100 mM) [190]. Os níveis de açúcar endógeno são tipicamente muito maiores em plantas que em animais; no entanto, mesmo utilizando soluções saturadas de glicose nos ensaios enzimáticos com a AR de milho, não foi detectada atividade enzimática. A direção desta reação *in vivo* também depende da relação NADP⁺/NADPH, que pode

4.2 AR do endosperma

apresentar diferentes gradientes nos diversos tecidos de plantas.

4.2.1 – Objetivos específicos

Realizar a caracterização cristalográfica da proteína aldose redutase do endosperma de milho (AKR4C7) livre (apoenzima), em conjunto com seus cofatores enzimáticos (NADPH e NADP⁺) e em complexos ternários, com o intuito de avaliar as características estruturais relacionadas com sua provável participação no metabolismo de sorbitol e acúmulo de amido na semente, bem como auxiliar na identificação de diferenças funcionais em relação à homóloga humana. Para tal as seguintes etapas foram realizadas:

- Cristalização da apoenzima AKR4C7, complexos com os cofatores enzimáticos (NADPH ou NADP⁺) e complexos ternários com análogos de substratos;
- Realização de coletas de dados de difração de Raios X para os monocristais obtidos;
- Resolução das estruturas de alta resolução para os dados cristalográficos coletados;
- Realização de análises estruturais comparativas dos modelos obtidos e com modelos de ARs de outros organismos, principalmente humana;
- Análises complementares visando compreender a atividade diferenciada da AKR4C7 frente ao sorbitol.

4.2.2 – Modelos estruturais

Estudos cristalográficos da apoenzima AKR4C7 foram iniciados com objetivo de obter modelos estruturais de alta resolução que podem ajudar na compreensão dos mecanismos de funcionamento da AR do endosperma de milho e a sua provável participação na biossíntese de amido neste tecido.

Condições iniciais de cristalização para esta proteína já haviam sido identificadas previamente em estudos realizados pelo aluno de mestrado Eduardo Kiyota do IQ/UNICAMP, também orientado pelo Prof. Ricardo Aparicio. Diferentes cristais na forma de pequenas agulhas e placas foram observados nas condições números 9, 18 e 22 do *Crystallization Basic kit* e números 22, 26 e 38 do *Crystallization Extension kit* para proteínas.

Após a identificação destas condições iniciais de cristalização, realizamos o refinamento das mesmas visando obter monocristais adequados aos experimentos de difração. Diversos experimentos de refinamento das condições de cristalização foram realizados, porém nenhum monocristal foi obtido como resultado. Na tentativa de obter estes monocristais também lançamos mão da técnica de *seeding*, na qual gotas de cristalização com a concentração da proteína reduzida pela metade foram semeadas, e utilizamos aditivos, em geral pequenas moléculas e alguns detergentes. Mesmo após todos estes experimentos somente cristais na forma de placas que cresceram em conjunto em ~2 semanas foram observadas, figura 4.2.

Estes cristais foram obtidos numa solução consistindo de 0,1 M TRISnitrato, pH 6,5, 26 % m/v PEG 4.000 e 0,2 M acetato de sódio correspondente à condição número 22 do *Crystallization Basic Kit*. Após a quebra e separação manual de uma das placas, o cristal foi exposto ao feixe de Raios X utilizando um suplemento de 15 % v/v de etilenoglicol como con-

4.2 AR do endosperma



Figura 4.2: Cristais típicos de AR que cresceram em forma de placas. As dimensões máximas das placas são \sim 400 x 200 x 50 μ m. A foto foi adquirida utilizando luz polarizada.

dição de crioproteção.

Um conjunto de dados de difração, a uma resolução máxima de 2,0 Å, foi coletado no LNLS mediante a proposta de pesquisa D03B-MX1-6344 (Caracterização e coleta de dados de cristais de aldose redutase de milho em duas formas cristalinas). Numa segunda oportunidade, coletamos dados na linha MX2 e conseguimos obter um conjunto a uma resolução máxima de 1,45 Å. Porém, devido ao elevado espalhamento difuso dos Raios X em baixa resolução (elevado *background*), decorrente do maior tempo de exposição usado na aquisição das reflexões de maior resolução, o conjunto de dados foi coletado em duas etapas: foi feita uma aquisição das imagens de difração a uma resolução máxima de 1,45 Å (alta resolução, 189 imagens) e em seguida a uma resolução máxima de 4,0 Å (baixa resolução, 43 imagens), figura 4.3.

Após o processo de redução de dados o cristal apresentado na figura 4.2 foi identificado como pertencente ao grupo de espaço $P2_12_12_1$ com parâmetros de rede a = 48,2 Å, b = 56,0 Å e c = 103,3 Å. Em se-



Figura 4.3: Imagens de difração do cristal de AKR4C7. a) imagem adquirida com 0,7° de oscilação correspondente ao conjunto de imagens de alta resolução. Uma expansão da região com elevado *background* também é apresentada com contraste adequado, mostrando os pontos de difração que também foram coletados. b) imagem adquirida com 4° de oscilação correspondente ao conjunto de imagens de baixa resolução.

4.2 AR do endosperma

guida, o problema das fases foi resolvido através do método da substituição molecular utilizando o procedimento automatizado implementado no programa *MrBUMP*. Um artigo descrevendo a cristalização da AR do endosperma de milho, processamentos e os detalhes da solução da estrutura já foi publicado no artigo científico intitulado "*Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of maize aldose reductase*" [191].

O modelo final da apoenzima AKR4C7 apresenta o motivo $(\alpha/\beta)_8$ -barril característico das proteínas membro da superfamília AKR, como sugerido pelo próprio nome, formado por oito folhas beta $(\beta_1 - \beta_8)$ e oito hélices alfa $(\alpha_1 - \alpha_8)$ que são intercaladas por *loops*. Além desses elementos de estrutura secundária regularmente dispostos, existem duas hélices alfa auxiliares (H₁ e H₂), uma precedendo a α_7 e outra após a α_8 , figura 4.4.

O modelo final consiste de uma molécula da proteína na ASU apresentando o motivo $(\alpha/\beta)_8$ -barril característico das proteínas membro da superfamília AKR e 346 moléculas de água. O refinamento convergiu para valores de R_{factor} e R_{free} iguais a 16,6 % e 20,0 %, respectivamente, para um total de 49.709 reflexões numa região de resolução de 49,21-1,45 Å, tabela 4.1.

O modelo apresenta boa estereoquímica geral com valores de RMSD de 0,028 Å e 2,285° para comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, e um valor de B-fator médio para todos os átomos de 18,4. Além das águas e dos 263 resíduos de aminoácidos modelados, de um total de 310 equivalentes a cadeia polipeptídica da AKR4C7, seis moléculas correspondentes a ligantes provenientes da solução de cristalização foram modeladas, entre elas estão cinco moléculas de etilenoglicol (código PDB para ligantes: EDO) e uma molécula para o ânion nitrato (código PDB para ligantes: NO3). Aqueles resíduos de aminoácidos não modelados correspondem à metionina N-terminal (Met1), e os *loops* His83-His84, Arg115-Phe132 e Arg285-Leu310 (C-terminal).



Figura 4.4: Representação em *cartoon* do motivo $(\alpha/\beta)_8$ -barril característico da superfamília AKR. Figura preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, http://www.pymol.org) usando um esquema de cores para estrutura secundária: hélices- α (vermelho), folhas- β (amarelo) e *loops* (verde).

Tabela 4.1: Estatísticas dos processamentos dos dados da AKR4C7.

Forma cristalina	Ortorrômbica	
Estatísticas da coleta de dados		
λ (Å)	1,425	
Grupo de espaço	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	
Parâmetros de cela unitária		
a (Å)	48,2	
b (Å)	56,0	
c (Å)	103,3	
Região de resolução (Å)	49,21-1,45 (1,53-1,45)	
N° de reflexões únicas	49.709 (7.011)	
Completeza (%)	98,8 (97,1)	
Multiplicidade	5,2 (4,9)	
<i>Ι/σ(I</i>)	13,8 (2,8)	
R_{merge} (%)	7,3 (41,2)	
V_M (Å 3 Da $^{-1}$)	2,15	
Conteúdo de solvente (%)	42,34	
Estatísticas do refinamento		
R_{factor} (%)	16,6	
R_{free} (%)	20,0	
N° de resíduos de aminoácidos	263	
N° de moléculas de solvente	346	
Fator de temperatura médio	18,4	
RMSD para comprimentos de ligação (Å)	0,028	
RMSD para ângulos de ligação (°)	2,285	
Gráfico de Ramachandran		
Regiões mais favorecidas (%)	92,9	
Regiões adicionalmente permitidas (%)	7,1	
Outiliers (%)	0,0	

Os valores em parênteses referem-se à última camada de resolução. O valor de R_{free} foi calculado para 5 % das reflexões que não foram incluídas no refinamento.

4.2 AR do endosperma

Além do modelo estrutural para a apoenzima, trabalhamos no sentido de obter modelos estruturais de alta resolução para complexos formados entre a AKR4C7 e seus cofatores enzimáticos (NADPH ou NADP⁺) e complexos ternários entre a AKR4C7, um cofator e substratos/análogos de substratos, entre eles sorbitol, glicose, glicose-6-fosfato (G6P) e sorbitol-6-fosfato (S6P), visando adquirir mais informação estrutural que possa ajudar no entendimento da atividade catalítica da AKR4C7 de endosperma de milho.

Uma primeira tentativa neste sentido foi realizada através de experimentos de *soaking*, com cristais da proteína nativa e o posterior banho dos mesmos em soluções saturadas dos cofatores (NAPDH ou NADP⁺) e/ou substratos/análogos de substratos. Após o banho dos cristais da apoenzima nas soluções mencionadas, a maioria destes apresentaram rachaduras ou foram dissolvidos na solução do banho. Por isso, na sequência dos trabalhos, decidimos empregar a abordagem de cocristalização para a obtenção dos complexos. Nestes experimentos os cofatores e ligantes foram incubados com a proteína ainda em solução e, em seguida, tentamos cristalizar o complexo previamente formado.

Os ensaios de co-cristalização foram realizados com a AKR4C7 na concentração de ~9 mg/mL, soluções dos cofatores (NADPH ou NADP⁺) 50 mM e soluções dos substratos/análogos de substratos (sorbitol, glicose, G6P e S6P) 1 M. Para cada combinação de possíveis complexos, foram preparadas placas de cristalização empregando as condições de cristalização previamente conhecidas para a apoenzima, com pequenas variações: 0,1 M TRIS-nitrato, pH 6,0, 22 % m/v PEG 4.000 e 0,1 M acetato de sódio. Em aproximadamente dois meses monocristais para diferentes condições de co-cristalização foram formados, figura 4.5.



Figura 4.5: Melhores resultados dos ensaios de co-cristalização para a AKR4C7 com seus cofatores e substratos/análogos de substratos. Possíveis complexos: a) AKR4C7+NADPH, b) AKR4C7+NADP⁺, c) AKR4C7+NADPH+glicose, d) AKR4C7+NADPH+sorbitol, e) AKR4C7+NADP⁺+G6P e f) AKR4C7+NADP⁺+sorbitol. Os cristais apresentam dimensões máximas entre ~100-300 μ m. As fotos apresentadas foram adquiridas utilizando luz polarizada.
Pelo menos um monocristal de cada uma das condições de cocristalização foi testado no gerador de Raios X do tipo Ânodo Rotatório (GAR) do LNLS. Estes testes permitiram verificar que os cristais formados eram realmente cristais de proteína e não do sal utilizado na solução de cristalização, e que os cristais apresentaram qualidade adequada aos experimentos de difração de Raios X. A coleta de dados foi realizada na linha W01B-MX2 do LNLS mediante a proposta de pesquisa na modalidade *Fast track* (Caracterização cristalográfica de complexos da enzima Aldose Redutase de Milho).

Após os experimentos de difração de Raios X e processamentos preliminares verificamos que não foram formados complexos ternários. A não ligação dos substratos/análogos de substratos não é um resultado inesperado já que é muito provável que mesmo no estado cristalino a enzima tenha catalisado a reação destas espécies aos seus respectivos produtos e estes, por sua vez, tenham sido eliminados do sítio ativo. Infelizmente, mesmo no caso dos análogos fosfatados parece que o mesmo evento ocorreu.

Devido à considerável dificuldade na obtenção de complexos ternários da AKR4C7, realizamos um estágio no *York Structural Laboratory* (YSBL, *The University of York*, York - Inglaterra) sob orientação do Prof. Garib Murshudov, no período de maio a setembro de 2009 com bolsa PDEE/CAPES, objetivando o aprendizado de técnicas que permitissem contornar esse problema. Vários métodos biofísicos [192, 193, 194], entre eles Calorimetria de Titulação Isotérmica [195] e Espectroscopia Diferencial no UV/VIS [196], foram empregados na análise da formação dos complexos ternários em solução, para que somente após a comprovação da existência dos mesmos realizássemos os ensaios de cristalização; porém, esta abordagem também não apresentou sucesso, principalmente devido à interferência dos cofatores enzimáticos NADPH e NADP⁺ em

tais métodos.

Ainda durante o estágio, análises de modelos estruturais de ARs humanas complexadas com inibidores permitiu a identificação de uma característica importante para a formação de tais complexos: a existência de um grupo carboxílico nos ligantes. Assim, reiniciamos os experimentos de cristalização utilizando dois novos análogos de substrato com esta característica, ácido hexanóico (AH) e ácido glucônico (AG). Diversos ensaios empregando diferentes *kits* de cristalização (*Crystal Screen* I & II, CCS I & II, PACT, Peglon e Index) foram realizados no robô Mosquito do YSBL que permitiram a identificação de uma nova condição de cristalização para os complexos com os novos análogos de substrato: 0,1 M acetato de sódio, pH 4,5 e 25 % m/v PEG 3.350 (*kit* Index, condição D5), figura 4.6.



Figura 4.6: Cristais obtidos para os complexos ternários da AKR4C7+NADP⁺ e novos análogos de substratos: a) AKR4C7+NADP⁺+AH e b) AKR4C7+NADP⁺+AG. Os cristais apresentam dimensões máximas entre \sim 50-100 μ m. As fotos foram adquiridas utilizando luz polarizada.

Dados de difração para estes cristais foram coletados nas linhas ID14-1 e ID14-4 do *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) utilizando o tempo de linha disponível para projetos de pesquisa dos pes-

quisadores do YSBL, o que permitiu a solução de duas novas estruturas de complexos ternários, uma para cada ligante em combinação com o NADP⁺. Os processamentos destes dados e daqueles coletados no LNLS permitiram a obtenção de quatro estruturas cristalográficas para complexos da proteína AKR4C7. Os parâmetros dos cristais, da coleta de dados e estatísticas dos processamentos para cada um destes conjuntos é apresentado na tabela 4.2.

Os modelos para os complexos com os cofatores enzimáticos foram obtidos por substituição molecular com o programa *MOLREP* enquanto aqueles para os complexos ternários foram resolvidos com o programa *BALBES*. Estes últimos apresentaram densidades eletrônicas bem definidas para os cofatores NADP⁺ e ligantes, porém para os complexos só com os cofatores (NADPH e NADP⁺), somente a porção adenosina-2'-5'-difosfato foi observada nos mapas de densidade eletrônica, fato provavelmente relacionado à alta mobilidade da porção nicotinamida dos cofatores nestas estruturas. Os conteúdos da unidade assimétrica dos modelos para os complexos da AKR4C7 são apresentados na figura 4.7.

Apesar da diferença do número de cópias nas unidades assimétricas, os modelos obtidos apresentam o mesmo motivo estrutural $(\alpha/\beta)_8$ barril, diferindo, basicamente, pela presença dos cofatores e análogos de substratos, sendo que, no caso particular dos complexos ternários com ácido hexanóico e ácido glucônico, uma densidade eletrônica contínua e bem definida, correspondente ao cofator enzimático incluindo a porção nicotinamida, foi observada. A observação desta densidade para o anel nicotinamida é provavelmente decorrente da estabilização desta porção pela presença dos ligantes no sítio ativo, o que indica, pelo menos inicialmente, que no caso da AR de endosperma de milho a presença de substratos/ligantes é importante para estabilidade do cofator enzimático. Tabela 4.2: Parâmetros dos cristais e estatísticas dos processamentos dos dados para os complexos da enzima AKR4C7.

Complexos	AR+NADPH	AR+NADP ⁺	AR+NADP ⁺ +AH	AR+NADP++AG
Linha de luz	MX2/LNLS	MX2/LNLS	ID14-1/ESRF	ID14-4/ESRF
λ (Å)	1,458	1,458	0,9334	0,9765
Grupo de espaço	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$
Parâmetros de cela unitária				
a (Å)	47,3	47,2	114,3	114,7
b (Å)	56,1	55,9	115,6	115,5
c (Å)	106,1	105,7	123,4	124,9
N° de moléculas na ASU	1	1	4	4
Região de resolução (Å)	106,1-1,8 (1,9-1,8)	105,1-1,7 (1,8-1,7)	84,4-2,9 (3,0-2,9)	84,8-2,3 (2,4-2,3)
N° de reflexões únicas	28.487 (3.901)	27.864 (3.244)	36.952 (5.302)	73.980 (10.697)
Completeza (%)	99,1 (95,2)	91,7 (74,8)	99,9 (100,0)	99,6 (99,8)
Multiplicidade	4,7 (4,5)	4,8 (4,6)	7,2 (7,3)	6,8 (6,9)
$I/\sigma(I)$	7,4 (2,0)	11,6 (2,0)	10,3 (2,1)	10,4 (2,0)
<i>R_{merge}</i> (%)	11,4 (61,0)	6,9 (64,3)	17,2 (104,1)	9,8 (88,9)
V_M (Å 3 Da $^{-1}$)	2,03	2,02	2,95	2,99
Conteúdo de solvente (%)	39,55	39,07	58,33	58,93

Os valores em parênteses referem-se à última camada de resolução.



Figura 4.7: Conteúdos das ASUs para os modelos cristalográficos dos complexos da enzima AKR4C7. a) ASU do complexo AKR4C7+NADPH (1 molécula/ASU). b) ASU do complexo AKR4C7+NADP⁺+HA (4 moléculas/ASU). Os códigos PDB para ligantes também são apresentados: adenosina-2'-5'-difosfato (A2P), etilenoglicol (EDO), NADP⁺ (NAP) e ácido hexanóico (6NA).

9**2**



Figura 4.7: Continuação da figura com os modelos cristalográficos dos complexos da enzima AKR4C7. c) ASU do complexo AKR4C7+NADP⁺ (1 molécula/ASU). d) ASU do complexo AKR4C7+NADP⁺+HG (4 moléculas/ASU). Os códigos PDB para ligantes também são apresentados: adenosina-2'-5'-difosfato (A2P), etilenoglicol (EDO), NADP⁺ (NAP) e ácido glucônico (GCO).

O refinamento estrutural para todos os modelos de complexos da proteína AKR4C7 está praticamente finalizado; porém, somente o modelo de alta resolução para a apoenzima do endosperma da semente de milho está terminado e foi devidamente validado. Os modelos cristalográficos para os complexos serão finalizados nos próximos meses, o que ajudará na identificação dos fatores estruturais correlacionados com a predileção da catálise de sorbitol à glicose, em detrimento da reação inversa, pela aldose redutase de endosperma de milho.

4.2.3 – Análises preliminares dos modelos

Análises preliminares dos modelos da apoenzima AKR4C7 e para os modelos ainda não finalizados dos complexos permitiram observar mudanças nas posições de alguns resíduos de aminoácidos que compõem a tétrade catalítica desta classe de enzimas, porém comparações com modelos de alta resolução com a AR humana (apoenzima e complexos) demonstraram que estas modificações são específicas para a AR de milho, figura 4.8.

A superposição dos diferentes modelos estruturais obtidos para a enzima AKR4C7 demonstrou que os resíduos Tyr49 e His111 da tétrade catalítica apresentam conformações diferentes quando em complexo ternário (figura 4.8 a), indicando, neste caso, que a presença dos ligantes induzem re-organização do sítio ativo de modo a proporcionar a condição geométrica necessária para a catálise. Porém, a análise do sítio ativo de diferentes modelos cristalográficos para a aldose redutase humana, apoenzima (código PDB: 1XGD) [197], complexo com o cofator NADP⁺ (código PDB: 1ADS) [198] e complexo ternário com o cofator NADP⁺ e o ligante ácido hexanóico (código PDB: 2IQ0) [199], demonstraram que esta configuração para o complexo ternário da AKR4C7 é, na realidade,



Figura 4.8: Representação da tétrade catalítica dos modelos da AKR4C7 e alguns modelos cristalográficos da AR humana. a) resíduos da AKR4C7 incluindo o cofator enzimático NADP⁺ ou sua porção adenosina-2'-5'-difosfato modelada e os ligantes ácido hexanóico e ácido glucônico. b) resíduos da AR humana incluindo o cofator enzimático NADP⁺ e o ligante ácido hexanóico. c) superposição de todos os modelos: apoenzima AKR4C7, AKR4C7+NADPH, AKR4C7+NADP⁺ e complexos ternários da AKR4C7 (cinza) e modelos da apoenzima AR humana, AR humana+NADP⁺ e complexo ternário da AR humana com NADP⁺ e ácido hexanóico (amarelo). Figura preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, http://www.pymol.org).

a mesma conformação dos resíduos que compõem a tétrade catalítica da aldose redutase humana (figura 4.8 b) e c). Desse modo, as modificações observadas entre os modelos da AR de endosperma não são suficientes para explicar a característica antagônica da AR de milho na catálise da redução de glicose à sorbitol.

Regiões estruturais que podem ter alguma relação com a predileção por parte da AKR4C7 para o sorbitol são os *loops* responsáveis por acomodar o cofator enzimático e os substratos. O papel destas regiões altamente flexíveis na especificidade de substratos para ARs de diferentes organismos tem sido investigado [182, 200], sendo sugerido, inclusive, que a etapa determinante da cinética de conversão de açúcares aos seus respectivos álcoois corresponde às mudanças conformacionais em um desses loops para a liberação do cofator após a catálise [201, 202]. Assim, a correta modelagem dessas regiões assume papel de extrema importância na obtenção de modelos estruturais que permitam entender os mecanismos de funcionamento da aldose redutase do endosperma da semente de milho. Entretanto, em decorrência da alta flexibilidade, mesmo na forma cristalina, muitas vezes mapas de densidades eletrônicas para algumas destas regiões não são observados. Por isso, somente após a finalização do refinamento das estruturas da AKR4C7, incluindo a modelagem, quando possível, dos resíduos presentes em regiões de loops, poderemos apontar se estes elementos estruturais estão relacionados com o funcionamento desta enzima.

Adicionalmente, colaboradores iniciaram estudos de Dinâmica Molecular comparativos entre os modelos cristalográficos da AR humana e até o momento para a apoenzima AKR4C7, mas em seguida para os outros modelos de complexos da AR de endosperma finalizados, com objetivo de adquirir informações sobre a dinâmica destes sistemas que possam ajudar na compreensão do seu funcionamento diferenciado em termos

do metabolismo de glicose (em humanos) e de sorbitol (na semente do milho).

4.2.4 – Conclusões parciais

Modelos cristalográficos para a enzima aldose redutase do endosperma da semente de milho (apoenzima, complexos com cofatores enzimáticos e complexos ternários) foram obtidos após diversos experimentos de cristalização e de difração de Raios X. Um modelo de alta resolução para a apoenzima foi finalizado apresentando o motivo estrutural $(\alpha/\beta)_8$ -barril característico de proteínas da família aldo-ceto redutase. Os modelos para os complexos com cofatores enzimáticos (NADPH e NADP⁺) e complexos ternários com os análogos de substrato ácido hexanóico e ácido glucônico estão em fase final de refinamento. Uma análise preliminar destes modelos em conjunto com o da apoenzima revelou que os resíduos Tyr49 e His111 que compõem a tétrade catalítica apresentam conformações diferentes no caso dos complexos ternários, porém ao analisar os modelos estruturais da AR humana, foi observado que esta é, na realidade, uma conformação típica do sítio ativo destas enzimas. Outras regiões que podem ter relação com a afinidade da AKR4C7 frente ao sorbitol e não à glicose são alças flexíveis que ainda estão em fase de construção no caso dos modelos para os complexos. Após a finalização dos modelos, estas regiões estruturais serão minuciosamente analisadas. Além disso, a dinâmica das ARs humana e de endosperma da semente de milho estão sendo avaliadas por colaboradores através de simulações por Dinâmica Molecular, o que poderá ajudar no entendimento do papel da aldose redutase AKR4C7 no metabolismo de sorbitol.

Além dos estudos cristalográficos com a proteína AKR4C7 do endosperma, também realizamos a caracterização cristalográfica de outra AR presente na semente do milho. Em estudos anteriores, foi verificado que anticorpos policionais preparados contra a proteína recombinante AKR4C7 reagiram com pelo menos outras três proteínas semelhantes a ARs em semente de milho [177]. Uma dessas proteínas é específica do embrião (AKR4C13) e é aparentemente mais abundante nas fases iniciais do desenvolvimento da semente. A enzima AKR4C13 também apresenta atividade típica de membros da família AKR e mostra-se capaz de converter sorbitol a glicose, uma atividade que parece estar adaptada à semente do milho e que permite o desenvolvimento dos embriões pela metabolização de uma quantidade substancial do sorbitol oriundo do endosperma.

4.3.1 - Objetivos específicos

Realizar a caracterização da aldose redutase específica do embrião de milho (AKR4C13) por Cristalografia, visando avaliar as características estruturais que podem estar relacionadas com seu papel também no metabolismo de sorbitol na semente. Para alcançar tal objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

- · Cristalização da enzima AKR4C13 específica de embrião de milho;
- Coleta dados de difração de Raios X para os monocristais obtidos;
- Resolução da estrutura de alta resolução para os dados cristalográficos coletados;
- Caracterização da estrutura secundária desta enzima e sua estabilidade térmica por Dicroísmo Circular;

- Avaliação da possível reação entre o cofator enzimático NADPH e o ácido succínico componente do tampão de cristalização;
- Realização de análises estruturais comparativas dos modelos obtidos com modelos de outras ARs.

4.3.2 – Caracterização cristalográfica e espectroscópica

Diversos experimentos de cristalização da apoenzima AKR4C13 e complexos com o cofator NADPH foram realizados empregando o método da gota suspensa e os *kits* de cristalização *Basic* e *Extension*. O resultado destes experimentos levou à identificação de condições de cristalização apenas para o complexo AKR4C13+NADPH nas composições número 9 (0,1 M citrato de sódio, pH 5,6, 30 % m/v PEG 4.000 e 0,2 M acetato de amônio) e número 28 (0,1 M cacodilato de sódio, pH 6,5, 30 % m/v PEG 8.000 e 0,2 M acetato de amônio) do *Crystallization Basic kit*; porém, somente com a obtenção de cristais na forma de pequenas agulhas que, mesmo após sucessivos refinamentos das condições de cristalização, permaneceram com esta morfologia inadequada aos experimentos de difração.

Como estávamos a caminho do estágio realizado no YSBL, também desenvolvemos a continuação deste projeto em York. Diversos experimentos de *seeding* e novos ensaios de cristalização empregando os *kits Crystal Screen* I & II, CCS I & II, PACT, Peglon e Index foram realizados com o robô Mosquito do YSBL. Melhores cristais foram obtidos nas condições A1/A2 do PACT *kit* compostas pelo tampão SPG (ácido succínico, fosfato de sódio e glicina, na relação molar de 2:7:7), pH 4,5 e 25 % m/v PEG 1.500, mas estes cristais continuaram como agulhas. Só obtivemos sucesso na cristalização do complexo AKR4C13+NADPH ao também utilizar o aditivo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) 10 mM, figura 4.9.



Figura 4.9: Monocristal obtido para o complexo da AKR4C13+NADPH após a utilização do aditivo NAD. A figura mostra o monocristal imerso na solução do crioprotetor e montado na alça de *nylon* utilizada durante a coleta de dados.

Para a caracterização cristalográfica, o cristais obtidos foram crioprotegidos usando suplemento de 20 % v/v de etilenoglicol e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida estes foram enviados ao European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, França) para coleta remota de dados de difração na linha de luz ID14-1 utilizando tempo de linha disponível para o YSBL. Um total de 360 imagens foi coletado utilizando uma região de oscilação de 0,5° de rotação por imagem. Os dados de difração de Raios X coletados foram reduzidos com os programas MOSFLM e SCALA. A estrutura para o complexo da AKR4C13 com o cofator enzimático NADPH foi resolvida por substituição molecular utilizando o servidor online do programa BALBES disponível na página do YSBL (http://www.ysbl.york.ac.uk/YSBLPrograms/index.jsp). Um primeiro modelo estrutural com duas moléculas na unidade assimétrica foi construído automaticamente com o programa ARP/wARP [203]. O refinamento estrutural foi realizado com os programas REFMAC5 e Coot, aplicando nos estágios intermediários do refinamento vínculos de simetria não cristalográfica (NCS) [204] e na última etapa o refinamento de TLS

[205], convergindo para valores finais de R_{factor} e R_{free} iguais a 15,4 % e 18,9 %, respectivamente, tabela 4.3.

O modelo final apresentou duas cadeias polipeptídicas, duas moléculas do cofator NADPH, 817 águas, 20 moléculas de etilenoglicol e 3 glicinas. Estas últimas são provenientes do tampão de cristalização utilizado, enquanto as moléculas de etilenoglicol correspondem ao crioprotetor. A unidade assimétrica do modelo estrutura obtido para o complexo AKR4C13+NADPH é apresentada na figura 4.10.



Figura 4.10: Modelo cristalográfico para o complexo AKR4C13+NADPH composto por duas moléculas na ASU. Uma molécula de etilenoglicol utilizado como crioprotetor também foi modelada no sítio ativo, além de outras moléculas desta espécie e de glicina observadas em outras regiões da estrutura.

A razão para a obtenção do monocristal somente após utilização do aditivo NAD, que não é um cofator enzimático para esta classe de en-

Tabela 4.3: Estatísticas da coleta de dados de difração de Raios X e refinamento
estrutural do complexo AKR4C13+NADPH.

Forma cristalina	Monoclínica
Estatísticas da coleta de dados	
λ (Å)	0,9334
Grupo de espaço	$P2_1$
Parâmetros de cela unitária	
a (Å)	53,8
b (Å)	115,4
c (Å)	56,5
β (°)	104,2
Região de resolução (Å)	39,7-1,45 (1,53-1,45)
N° de reflexões únicas	117.957 (17.204)
Completeza (%)	100,0 (99,9)
Multiplicidade	3,7 (3,7)
l/σ(l)	12,8 (2,0)
R_{merge} (%)	6,7 (65,9)
Estatisticas do refinamento	
R_{factor} (%)	15,4
R_{free} (%)	18,9
Fator de temperatura médio	22,3
RMSD para comprimentos de ligação (A)	0,026
RMSD para ângulos de ligação (°)	2,446
Gráfico de Ramachandran	
Regiões mais favorecidas (%)	91,2
Regiões adicionalmente permitidas (%)	8,6
Regiões generosamente permitidas (%)	0,2
Outiliers (%)	0,0

Os valores em parênteses referem-se à última camada de resolução. O valor de R_{free} foi calculado para 5 % das reflexões que não foram incluídas no refinamento.

zimas e que não foi observado nos mapas de densidade eletrônica, foi investigada através de medidas espectroscópicas por Dicroísmo Circular. Amostras da apoenzima na concentração final de 1 μ M foram preparadas no tampão 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,2. Além das amostras da apoenzima também foram avaliadas por CD amostras da AKR4C13+NADPH (1:1 mol:mol) e AKR4C13+NADPH+NAD (1:0,5:0,5 mol:mol:mol). Nestes estudos foram feitas medidas dos espectros para cada amostra, predição da estrutura secundária para cada um destes espectros e a avaliação do efeito dos cofatores na estabilidade térmica desta enzima.

Os espectros para as três amostras avaliadas apresentaram pequenas diferenças, figura 4.11, que foram, por sua vez, interpretadas em termos da quantificação dos elementos de estrutura secundária utilizando os dados previstos pelo servidor *PSIPRED* para a estrutura primária, os dados gerados após a deconvolução espectral realizada no servidor *DichroWeb* e os dados calculados a partir da estrutura cristalográfica tridimensional resolvida, tabela 4.4.

É clara a diferença na absorção da radiação circularmente polarizada pela enzima AKR4C13 após a incubação com o cofator enzimático NADPH, principalmente pela diminuição do sinal e deslocamento do máximo de absorção de ~195 nm para ~190 nm. Quando os dois cofatores (NADPH e NAD) são usados em conjunto, apenas uma dimuição dos sinais correspondentes aos picos ~195 nm, ~215 nm e ~224 nm é observada. Estas modificações no sinal de CD revelam que ambos cofatores induzem modificações na absorção da radiação pelos cromóforos, provavelmente consequência da interação destes em regiões de hélices- α e folhas- β da proteína. A avaliação destas modificações em termos da quantificação dos elementos de estrutura secundária não apresenta nenhuma variação significativa para a apoenzima AKR4C13 e para o complexo AKR4C13+NADPH, porém é observada uma relativa mudança para

os valores de hélices- α e regiões randômicas quando esta enzima é incubada também com o NAD.



Figura 4.11: Espectros de CD para a proteína AKR4C13 livre e incubada com os cofatores NADPH e NAD. Todas as medidas apresentaram valores máximos de HT (*high tension voltage*) \simeq 600 volts, sem comprometer, dessa forma, a qualidade dos dados obtidos pela saturação do detector.

Programas/arquivos	Fonte de análise	Hélice- α (%)	Folha- β (%)	Loops
Servidor PSIPRED	Sequência de aminoácidos	38,9	13,2	47,9
Arquivo PDB	Coordenadas atômicas	40,4	13,5	46,1
Servidor <i>Dichroweb</i> (SELCON3)	Espectro da AKR4C13 Espectro da AKR4C13+NADPH	37,7 37,4	15,3 15,5	46,6 47,9

Tabela 4.4: Principais resultados da predição dos elementos de estrutura secundária da AKR4C13.

Para avaliar o papel do NAD como possível cofator estrutural, realizamos experimentos exploratórios de desnaturação térmica da proteína AKR4C7 por Dicroísmo Circular monitorando modificações no sinal de CD na região de temperatura de 35-75 °C. A temperatura de transição (T_m) do estado enovelado para o estado desenovelado foi determinada ajustando uma função de Boltzmann sigmoidal às curvas de desnaturação térmica, figura 4.12.



Figura 4.12: Curvas de desnaturação térmica para a proteína AKR4C13 nativa (apoenzima), incubada com os cofatores NADPH e NADPH+NAD.

Os valores de 58,5 °C, 59,6 °C e 59,8 °C foram obtidos para as T_m s correspondentes à apoenzima, AKR4C13+NADPH e AKR4C13+NADPH+NAD, respectivamente. O deslocamento observado

para os valores de T_m após a incubação da proteína com os cofatores é pequeno, em torno de 1 °C, o que não é suficiente para afirmar que estes conferem maior estabilidade térmica à proteína, embora seja observada uma leve tendência no aumento dos valores de T_m nas condições experimentais avaliadas. Estudos mais detalhados, com um número de repetições que apresente maior significância estatística, poderão ser feitos no futuro para investigar a obtenção de monocristais somente após a utilização do aditivo NAD. Por hora, a questão mais importante a ser abordada é a caracterização cristalográfica deste sistema.

Além de modelarmos uma molécula do cofator NADPH no sítio ativo de cada uma das cadeias polipeptídicas, verificamos que ocorreu modificação na porção nicotinamida do cofator enzimático, provavelmente decorrente de uma reação entre o ácido succínico (AS), componente do tampão de cristalização e o NADPH, modificando este último através de um ataque nucleofílico por parte do AS, com a eliminação do anel nicotinamida, figura 4.13.

A ocorrência deste tipo de reação de substituição nucleofílica não é evento totalmente incomum em estruturas proteicas. Uma classe de enzimas chamada ADP-ribosiltransferases são caracterizadas por catalisar reações de modificação pós-traducional através da inserção de porções de cofatores enzimáticos em determinados resíduos de aminoácidos que atuam como nucleófilos (argininas, cisteínas e lisinas) [206], demonstrando que, além de atuar em reações de oxidação-redução, cofatores enzimáticos também podem participar de outras reações químicas, figura 4.14.

No caso específico da proteína AKR4C13, acreditamos que tenha ocorrido um ataque nucleofílico no NADPH por parte do ácido succínico de modo equivalente à reação de ADP-ribosilação, mas não como uma modificação pós-traducional. Experimentos típicos de cinética enzimática



Figura 4.13: Mapa de densidade eletrônica $2F_{o}$ - F_{c} (1,0 σ) correspondente à molécula do cofator enzimático NADPH observado no sítio ativo da proteína AKR4C13. É possível notar o grupo fosfato característico do cofator NADPH, ausente no cofator NAD, e ainda que o mapa na porção superior da estrutura do cofator não corresponde ao anel nicotinamida, sendo interpretado como o resultado da substituição nucleofílica deste anel pelo ácido succínico componente do tampão de cristalização. Esta modificação foi modelada com uma dupla conformação para melhor interpretação dos mapas. Como este é um novo ligante, um código PDB inédito para ligantes foi utilizado: SYP.



Figura 4.14: Esquema de reações que usam cofatores enzimáticos. Estas espécies estão envolvidas basicamente em três tipos de reação: oxidação-redução (onde não há consumo dos cofatores), ADP-ribosilação (1) e adenilação (2). Figura adaptada da referência [206].

foram realizados em condições similares às de cristalização com intuito de verificar esse possível ataque nucleofílico por parte do AS e a participação da enzima nesta reação, figura 4.15.



Figura 4.15: Experimentos de cinética enzimática realizados na avaliação do possível ataque nucleófilico do ácido succínico ao cofator enzimático NADPH.

Os experimentos de cinética foram realizados na presença e ausência da proteína AKR4C13 com intuito de avaliar se a modificação observada no cofator enzimático era dependente da participação da enzima. Em ambos os casos foi verificada uma pronunciada diminuição do sinal de absorbância com o decorrer do tempo de experimento, consequente da atuação do ácido succínico na porção nicotinamida (cromóforo) do cofator NADPH. O mecanismo sugerido para este ataque nucleofílico, em meio

ácido, leva a susbstituição do anel nicotinamida pelo ácido succínico, com eliminação de uma molécula de água e a consequente desestabilição do sistema aromático que atuava como cromóforo, o que corrobora a modificação observada nos mapas de densidade eletrônica para o cofator e demonstra que esta reação ocorreu independentemente da participação da AKR4C13.

4.3.3 – Sítio ativo de ARs de plantas

Algumas aldose redutases de plantas já tiveram sua estrutura tridimensional caracterizada através da técnica de cristalografia, são elas uma aldose redutase de cevada (códigos PDB: 2BGQ, 2BGS e 2VDG) [207], de *Arabidopsis thaliana* (códigos PDB: 3H7R e 3H7U) [200] e também as ARs de endosperma e embrião de milho caracterizadas nesta tese (AKR4C7 e AKR4C13). Estas diferentes estruturas foram superpostas e os resíduos que compõem a tétrade catalítica estão dispostos praticamente nas mesmas orientações, com exceção daqueles para o modelo estrutural da apoenzima AKR4C7 e complexos com os cofatores enzimáticos NADPH e NADP⁺, figura 4.16.

Do mesmo modo que para a AKR4C7, a análise preliminar dos modelos da enzima AKR4C13 também não revelou nenhuma característica estrutural marcante que explique a ausência de atividade enzimática para a redução da glicose à sorbitol. Além disso, os resíduos do sítio ativo de aldose redutases de plantas apresentam praticamente a mesma conformação. O modelo cristalográfico da enzima AKR4C13 também será incluído nos estudos por Dinâmica Molecular com a finalidade de auxiliar na investigação da questão biológica da participação das ARs de milho no metabolismo de sorbitol.

Os resultados desta caracterização cristalográfica preliminar incluindo



Figura 4.16: Representação em estéreo do sítio ativo das diferentes ARs de plantas que tiveram suas estruturas caracterizadas por cristalografia. Resíduos do sítio ativo da AR de embrião de milho (Asp54, Tyr59, Lys87 e His120) incluindo o cofator enzimático NADPH modificado pelo ácido succínico (código PDB para ligantes: SYP) e uma molécula de etilenoglicol modelada no sítio ativo (EDO). O modelo da AKR4C13 está superposto aos modelos da AKR4C7 (em verde), cevada (em azul) e arabidopsis (em laranja). A figura foi preparada com o programa *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).

a obtenção, avaliação bioquímica e espectroscópica desta enzima específica do embrião estão sendo organizados na forma de um artigo científico sob título provisório de "*Biochemical and Structural Characterization of a New Aldose Reductase from Maize Embryo.*" que pretendemos submeter para publicação em breve.

4.3.4 – Conclusões parciais

A proteína aldose redutase AKR4C13 de embrião da semente de milho foi caracterizada por cristalografia em complexo com o seu cofator enzimático NADPH após diversas tentativas de cristalização, sendo necessária a utilização do aditivo NAD para a obtenção de monocristais adequados aos experimentos de difração. Estudos espectroscópicos por Dicroísmo Circular não foram definitivos na avaliação da participação do NAD na estabilização da estrutura da proteína AKR4C13. Para nossa surpresa, o cofator enzimático NADPH foi modificado pela ação do ácido succínico presente na solução de cristalização e este produto da reação é que foi modelado no sítio ativo e será depositado pela primeira vez no PDB sob código de três letras SYP. O modelo de alta resolução final apresentou uma molécula de etilenoglicol no sítio ativo, exatamente na posição de ligação dos substratos. Análises comparativas da AR de embrião em conjunto com outros modelos estruturais para ARs de plantas revelou que esta nova aldose redutase de milho apresenta praticamente a mesma organização, não sendo ainda possível apontar as características estruturais relacionadas com sua participação no metabolismo de sorbitol na semente.

Capítulo 5

Trabalhos adicionais

Em trabalhos adicionais, participamos da caracterização estrutural de proteínas de cana-de-açúcar e do patógeno de citros *Xylella fastidiosa*. Nestas pesquisas, atuamos em diferentes etapas de estudos cristalográficos, principalmente cristalização e na coleta de dados de difração de Raios X, estudos em solução por SAXS e ainda no estabelecimento de protocolos de clonagem, expressão e purificação. Na maioria deles, nossa participação foi pontual, já que tais trabalhos configuram partes importantes de dissertações e teses de outros alunos de nosso grupo ou de colaboradores.

5.1 – Proteínas de cana-de-açúcar

As proteínas de cana-de-açúcar estudadas tiveram seus genes codificantes sequenciados no SUCEST (*SUgar Cane Expressed Sequence Tag*, http://sucest.lad.ic.unicamp.br). Trabalhamos no sentido de obter algumas enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose. Realizamos estudos estruturais de uma proteína que atua na regulação da expressão de genes, um fator de transcrição, e procedemos à reprodução dos protocolos de expressão e purificação de uma enzima que atua na síntese de purinonucleotídeos.

Clones com genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de sacarose em cana-de-açúcar foram requisitados à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/SUCEST). Neste caso específico, participamos do estabelecimento dos protocolos de clonagem, expressão e purificação de uma enzima chamada UGPase (UTP: α -D-glicose-1-fosfato uridililtransferase, EC 2.7.7.9) que catalisa a produção reversível de UDP-glicose e difosfato a partir de α -D-glicose-1-fosfato e UTP [208]. Estes experimentos foram realizados no Laboratório do Prof. Marcelo Menossi Teixeira, na época do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP e atualmente do Instituto de Biologia da mesma instituição. Também realizamos uma caracterização inicial para a UGPase em solução através da técnica de SAXS, identificando-a no estado monomérico nas condições estudadas. Um artigo descrevendo a obtenção e caracterização estrutural inicial da UGPase de cana sob o título provisório de "Initial characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase from sugarcane by Small Angle X-ray Scattering" está em fase de redação e será submetido brevemente para publicação. E importante ressaltar ainda que estes resultados constituirão parte importante da tese de doutorado (IB/UNICAMP) do aluno José Sérgio Soares orientado por nosso colaborador Prof. Marcelo Menossi e co-orientado também pelo Prof. Ricardo Aparicio (IQ/UNICAMP).

O fator de transcrição de cana estudado (SCF5) foi preparado pelo aluno de mestrado Eduardo Kiyota do Instituto de Química (IQ) da UNICAMP, orientado pelo Prof. Ricardo Aparicio (IQ/UNICAMP) e coorientado pelo Prof. Marcelo Menossi, no CBMEG/UNICAMP. Esta proteína é membro da família *basic leucine zippers* (bZIPs), que são importantes reguladores de processos de sinalização em plantas, como res-

5.1 Proteínas de cana-de-açúcar

posta à luz, sinalização hormonal e defesa a patógenos [209]. Para esta proteína, realizamos experimentos de SAXS no LNLS mediante as propostas de pesquisa D11A-SAXS1-5294 e D11A-SAXS1-5855 (Determinação do envelope de proteínas bZIP complexadas com DNA). Os modelos de baixa resolução obtidos para o fator de transcrição de cana-de-açúcar, bZIP SCF5 ligado a DNA, indicam que esta proteína se encontra na forma de homodímero ligado ao DNA de modo assimétrico. Estes resultados foram tema da dissertação de caracterização estrutural dos fatores de transcrição bZIP SCF12 e SCF5 de cana-de-açúcar" e defendida em 08/08/2008 no IQ/UNICAMP.

Por fim, cepas de bactérias já transformadas com o gene que codifica uma última enzima de cana estudada, chamada PRS, e o plasmídeo recombinante, foram fornecidos pelo Prof. Otávio Henrique Thiemann do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP). A enzima PRPP sintase (ATP: D-ribose 5-fosfato pirofosfotransferase, EC 2.7.6.1), ou mais simplesmente PRS, atua na síntese de purinucleotídeos. Esta enzima catalisa a síntese do 5-fosforribosil-1pirofosfato (PRPP) através da transferência de ATP para ribose-5-fosfato. Dada à importância do PRPP, a PRS é uma enzima fundamental para o metabolismo celular. Os protocolos para clonagem, expressão, purificação e cristalização da PRS de cana já haviam sido determinados [210], dados cristalográficos iniciais coletados e estudos computacionais de modelagem por homologia realizados [211]. Estes esforços, entretanto, não foram suficientes para determinar a estrutura cristalográfica desta importante enzima. Por isso, procedemos à reprodução dos protocolos de preparação e cristalização da enzima PRS de cana-de-açúcar com objetivo de obter melhores monocristais que permitissem a solução da estrutura de alta resolução desta proteína. Apesar dos esforços empregados na obtenção e no refinamento das condições de cristalização da proteína PRS, incluindo a utilização de aditivos e ensaios de *seeding*, não conseguimos coletar um bom conjunto de dados que permitisse a solução de sua estrutura por Cristalografia.

5.2 – Proteínas da bactéria Xylella fastidiosa

As proteínas da bactéria *Xylella fastidiosa* também estudadas foram preparadas e purificadas por diferentes alunos do Laboratório de Análise Genética e Molecular (CBMEG/UNICAMP) sob orientação da Prof^a Anete Pereira de Souza. Nestes casos atuamos basicamente no refinamento de condições de cristalização previamente identificadas pelos alunos da Prof^a Anete e nos experimentos de difração de Raios X no LNLS mediante as seguintes propostas de pesquisa: D03B-MX1-7582 e D03B-MX1-7913 (Resolução tridimensional de proteínas relacionadas à patogenicidade de microorganismos) e D03B-MX1-8933 (Coleta de dados de cristais nativos e derivados da proteína VapD de *Xylella fastidiosa*).

Entre as proteínas de *Xylella* estudadas neste trabalho estão: VapD, que é similar a uma proteína associada a virulência encontrada em muitas outras bactérias patógenas [212]; AKR13B1, que possui um domínio comum as proteínas da superfamília aldo-ceto redutase (AKR) [213]; SHSP, que pertence a família de proteínas que funcionam como chaperonas moleculares prevenindo agregação protéica [214] e SurE, uma nucleotidase que catalisa a remoção de um grupo fosfato através da hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico [215].

Conseguimos obter monocristais e coletar conjuntos de dados para as proteínas VapD, SHSP e SurE tanto nativa quanto para o complexo desta proteína com o cofator enzimático Mn²⁺ e substrato adenosina 3'-monofosfato (3'AMP). O processamento dos dados cristalográficos e a obtenção dos modelos de alta resolução serão feitos por outros alunos do grupo ou de colaboradores.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho de tese de doutorado realizamos diversos estudos estruturais de diferentes proteínas purificadas de venenos de serpentes da fauna brasileira e outras recombinantes do endosperma e embrião da semente de milho. No total, oito estruturas cristalográficas (BjVIII e ARs de milho) foram resolvidas e dois modelos de SAXS foram obtidos (PLA2 de *C. d. cascavella*).

Análises dos modelos de SAXS obtidos e cristalográficos finalizados permitiram entender como algumas das proteínas de venenos de serpentes avaliadas se comportam em solução e que fatores estruturais estão relacionados com a função das mesmas, como no caso da atividade de agregação plaquetária atípica apresentada pela BjVIII do veneno de *Bothrops jararacussu*, ou ainda na alteração das atividades farmacológicas e mudanças conformacionais induzidas pelo tratamento da PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* com o flavonóide naringina. Em ambos os casos, características inéditas foram observadas nos modelos obtidos: pela primeira vez um lisofosfolipídio foi modelado no sítio ativo de uma PLA2, sendo proposto um novo mecanismo onde a fosfolipase atua como carreador desta molécula, um reconhecido fator de agregação plaquetária; no caso dos modelos de SAXS, uma configuração dimérica nunca antes observada para estas enzimas em solução foi proposta. Além disso, também observamos a formação de um agrupamento incomum de moléculas de água, pentagonalmente organizadas, na porção externa do canal hidrofóbico de cada uma das cadeias polipeptídicas dos modelos cristalográficos da BjVIII.

Diversos modelos cristalográficos também foram obtidos para duas aldose redutases de semente de milho, uma específica do embrião e outra do endosperma, sendo que alguns deles ainda estão em fase de finalização. Análises preliminares destes modelos foram realizadas mas ainda não revelaram nenhuma característica significativa que explique a predileção da catálise de sorbitol em detrimento de glicose, ao contrário do que ocorre para as ARs encontradas em humanos. Neste caso específico, colaboradores iniciaram estudos de simulação por Dinâmica Molecular com os diferentes modelos de ARs de milho e humanas (nativas, com os cofatores enzimáticos e em complexos ternários com análogos de substratos) visando entender esse comportamento diferenciado. Uma outra característica estrutural inédita também foi observada no modelo cristalográfico da enzima AKR4C13 do embrião em complexo com o cofator enzimático NADPH: os mapas de densidade eletrônica correspondentes à porção nicotinamida deste cofator foram melhor interpretados como resultado de uma modificação química desta espécie pelo ácido succínico componente do tampão de cristalização, sendo a molécula correspondente ao produto desta reação descrita por um novo código PDB de três letras para ligantes (SYP).

Por fim, iniciamos a caracterização cristalográfica de uma PLA2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (F17) e participamos também de diversos trabalhos estruturais adicionais que devem colaborar para um melhor entendimento das funções de algumas proteínas de cana-de-açúcar e da bactéria *Xylella fastidiosa*.

A partir dos dados gerados nesta tese, já publicamos dois artigos científicos em periódicos indexados. Os manuscritos de outros dois artigos já estão praticamente finalizados, atualmente em fase de correção para submissão. Acreditamos que com o resultado dos trabalhos desta tese seja possível submeter para publicação pelo mais quatro artigos científicos. Os modelos cristalográficos finalizados já foram devidamente validados e serão depositados nos próximos meses no *Protein Data Bank*, o que também ocorrerá para aqueles que se encontram na fase final de refinamento estrutural.
Apêndice A

Artigos publicados e em fase final de preparação

A.1 – Artigos publicados

Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications

ISSN 1744-3091

Eduardo Kiyota,^{a,b} Sylvia Morais de Sousa,^b‡ Marcelo Leite dos Santos,^a Aline da Costa Lima,^a Marcelo Menossi,^c José Andrés Yunes^d and Ricardo Aparicio^a*

 ^aLaboratório de Biologia Estrutural, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas-SP, Brazil,
 ^bCentro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil, ^cDepartamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil, and ^dLaboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas-SP, Brazil

‡ Current address: Horticultural Sciences Department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

Correspondence e-mail: aparicio@iqm.unicamp.br

Received 24 September 2007 Accepted 23 October 2007



© 2007 International Union of Crystallography All rights reserved

Maize aldose reductase (AR) is a member of the aldo-keto reductase superfamily. In contrast to human AR, maize AR seems to prefer the conversion of sorbitol into glucose. The apoenzyme was crystallized in space group $P_{2_12_12_1}$, with unit-cell parameters a = 47.2, b = 54.5, c = 100.6 Å and one molecule in the asymmetric unit. Synchrotron X-ray diffraction data were collected and a final resolution limit of 2.0 Å was obtained after data reduction. Phasing was carried out by an automated molecular-replacement procedure and structural refinement is currently in progress. The refined structure is expected to shed light on the functional/enzymatic mechanism and the unusual activities of maize AR.

1. Introduction

Proteins of the aldo-keto reductase (AKR) superfamily are monomeric $(\alpha/\beta)_8$ -barrel proteins of approximately 35 kDa in molecular weight which use NAD(P)(H) to catalyze the reduction of aldehydes and ketones, monosaccharides, ketosteroids, protaglandins and other specific substrates (Jez & Penning, 2001). AKRs occur in prokaryotes and eukaryotes, including yeast, plant, amphibia and mammals (Jez et al., 1997). Aldose reductase (AR; EC 1.1.1.21) is a member of the AKR superfamily (Bohren et al., 1989) that has a monomeric NADPH-dependent oxidoreductase activity with broad substrate specificity. In some species, AR is able to catalyze the reduction of glucose to sorbitol in the polyol pathway (Jez et al., 1997; Ueda et al., 2004). This pathway is especially relevant to diabetic patients. Hyperglycaemia causes an increased flux of glucose through the polyol pathway, which elicits various metabolic imbalances and early damage to tissues that undergo insulin-independent uptake of glucose, such as the lens, retina, peripheral nerve and renal glomerulus. For this reason, AR inhibition has been considered to be an attractive approach to halting long-term diabetic complications (Srivastava et al., 2005). Although the structure of AR has been extensively studied in humans (Rondeau et al., 1992; Wilson et al., 1992; Biadene et al., 2007), little is known about ARs in plants. Some evidence suggests that plant ARs are involved in abiotic stress resistance. For example, freezing treatment induces AR expression in brome grass (Lee & Chen, 1993) and in Xerophyta viscose AR is expressed under dehydration conditions (Mundree et al., 2000).

Barley AR is expressed in embryos with a pattern that correlates with the seed-maturation phase (Bartels *et al.*, 1991; Roncarati *et al.*, 1995). Likewise, rice AR is expressed at high levels when the seeds reach maturity (Sree *et al.*, 2000). In maize, on the other hand, AR is broadly expressed but is apparently more abundant in embryos, especially in the earlier phases of development. Maize AR not only displays the typical activity of AKR-family members, but is also able to convert sorbitol into glucose, an activity which seems especially adapted to maize seeds and allows developing maize embryos to metabolize substantial amounts of sorbitol from the endosperm (de Sousa *et al.*, work to be published). We have initiated a study that aims to understand the apparent preference of maize AR for sorbitol over glucose as a substrate, a feature that is the opposite of that observed in humans and fungi. Here, we report the crystallization of apo maize aldose reductase and its preliminary crystallographic analysis.

2. Material and methods

2.1. Cloning, expression and purification

Detailed methodology will be published elsewhere (de Sousa et al., work to be published). The gene encoding maize AR (DQ517521) was amplified and cloned into the vector pET28a (Novagen). Competent Escherichia coli strain BL21(DE3) pRil cells were transformed with positive recombinant plasmid and cultured in LB broth with 50 μ g ml⁻¹ kanamicin and 100 μ g ml⁻¹ chloramphenicol. Lactose (100 mM) was added to induce protein expression and incubation proceeded for an additional 6 h. The cells were harvested and pellets were resuspended in affinity buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.2) containing 100 mM NaCl and 5% glycerol. Lysozyme was added to a final concentration of 1.0 mg ml^{-1} . The suspension was incubated for 1 h at 277 K and sonicated. Insoluble debris was removed by centrifugation and the clarified supernatant was used for protein purification by IMAC (immobilized metalaffinity chromatography). The eluted maize AR was dialysed in anion-exchange buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 7 mM β -mercaptoethanol and 20 mM NaCl) and then purified on a Q-Sepharose FF anion-exchange chromatography column (1 ml; Amersham Biosciences, USA) using an ÄKTA FPLC system (Amersham Biosciences, USA). Bound proteins were eluted using an NaCl gradient. Protein concentration and purity was analyzed by SDS-PAGE. More accurate estimations for purified maize AR were made based on the absorbance at 280 nm, using a calculated extinction coefficient of 1.824 g l^{-1} cm⁻¹ (Pace & Schmid, 1997).

2.2. Crystallization

Initial crystallization conditions were screened in Tissue Culture Test Plates 24 (TPP) by the hanging-drop method at 293 K, using the sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) implemented in the Crystallization Basic and Extension Kits for Proteins (Sigma). Imperfect crystals were obtained in various conditions and were used as a guide for further optimization. Good diffracting crystals were obtained in a condition similar to condition 22 of the Crystallization Basic Kit. The optimum reservoir solution, consisting of 26% PEG 4000 (Sigma/Fluka), 0.2 M sodium acetate (Vetec) and 0.1 M Tris– HCl pH 6.5 (Vetec), was mixed with protein solution (10 mg ml⁻¹ in water) in equal amounts and equilibrated against reservoir solution.



Figure 1

Representative crystals of maize AR grown as clusters of plates with maximum dimensions of approximately 400 \times 200 \times 50 $\mu m.$

Table 1

Crystal parameters and data-collection statistics.

Values in parentheses are for the last resolution shell.

Space group	P212121
Unit-cell parameters (Å)	
a	47.2
b	54.5
С	100.6
Solvent content (%)	34.4
Molecules in ASU	1
Resolution range (Å)	50.32-2.00 (2.11-2.00)
No. of images	129
No. of observed reflections	77147 (11331)
No. of rejected reflections	2592
No. of unique reflections	18151 (2593)
Multiplicity	4.3 (4.4)
Completeness (%)	99.8 (99.8)
$R_{\rm sym}$ (%)	11.8 (38.5)
$\langle I/\sigma(I)\rangle$	9.7 (2.8)
Wilson plot B factor ($Å^2$)	24.3

Crystals were obtained as clusters of plates and grew to full size in two weeks at 293 K (Fig. 1). Attempts to obtain single crystals by the use of additives, seeding and other strategies were not succesful. However, single plates manually separated from the initial clusters exhibited good morphology and size and proved to be of sufficient quality for data collection.

2.3. Data collection and processing

Cryocrystallographic techniques (Garman & Schneider, 1997) were employed to prevent radiation damage. Crystals were briefly soaked in a cryoprotectant solution containing 15%(v/v) ethylene glycol and were rapidly frozen in a gaseous nitrogen stream at 100 K (Oxford Cryosystems). Data were collected by the oscillation method on beamline D03B-MX1 at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP, Brazil; Polikarpov *et al.*, 1998) using a MAR CCD 165 detector. The X-ray wavelength was 1.425 Å with a crystal-to-detector distance of 78.2 mm, giving an outer-edge resolution of 1.8 Å. The oscillation range was 1° and the exposure time per image was 240 s. Data reduction was performed with the packages *MOSFLM* and *SCALA* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997). A summary of crystal parameters and data-collection statistics is presented in Table 1.

3. Results and discussion

Initial attempts were made to solve the crystal structure of maize AR using homologous protein structures available in the Protein Data Bank. The program *MATTHEWS_COEF* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997) was used to calculate the Matthews coefficient (Matthews, 1968) and the Matthews probability (Kantardjieff & Rupp, 2003). Across all resolution ranges, including the high-resolution limit, the probability of $V_{\rm M} = 1.9$ Å³ Da⁻¹ and a solvent content of 34.4% was estimated to be 1.0, unequivocally indicating the presence of one molecule in the asymmetric unit. Primary sequence searches and sequence alignments were made with ENTREZ and *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997). Molecular-replacement trials were performed manually using the program *AMoRe* (Navaza, 1994; Winn *et al.*, 1997) and although there was an indication of possible solutions, the low contrast obtained suggested the application of automated methods.

Accordingly, the automated procedure for molecular replacement implemented in the program *MrBUMP* (Keegan & Winn, 2007) was adopted. *MrBUMP* employed the programs *FASTA* (Pearson & Lipman, 1988) and *CLUSTALW* (Chenna *et al.*, 2003) for the template search, *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997; Winn *et al.*, 1997) for molecular replacement and *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 1997) for initial evaluation of the possible solutions. The most successful model was prepared with *CHAINSAW* (Schwarzenbacher *et al.*, 2004; Winn *et al.*, 1997) from an homologous structure of pig aldose reductase complexed with sorbinil (PDB code 1ah0; Urzhumtsev *et al.*, 1997), the 11th hit in the primary *BLAST* search (48% sequence identity, corresponding to 138 of 285 amino-acid residues). After 30 cycles of automated restrained refinement, the *R* factor and $R_{\rm free}$ (5% of the total reflections) were 37.9% and 43.3%, respectively.

The low contrast in the solutions obtained from the manual molecular-replacement trials and the current relatively high value of R_{free} seem to be an indication that there are important differences in the three-dimensional structures of maize AR and other members of the AKR family, which could be related to its diverse properties as mentioned above. Refinement is in progress and the structural details will be reported in due course.

This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) *via* grant 01/07546-1 (to MM). SMS was supported by a postdoctoral fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). MLS received a PhD fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). ACL was funded by a studenship from Serviço de Apoio ao Estudante (SAE)/ Unicamp. We are also grateful to the LNLS D03B-MX-1 beamline staff and Professors Anita J. Marsaioli and Inès Joekes (IQ/Unicamp) for providing part of the laboratory facilities.

References

- Altschul, S. F., Madden, T., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.
- Bartels, D., Engelhardt, K., Roncarati, R., Schneider, K., Rotter, M. & Salamini, F. (1991). *EMBO J.* **10**, 1037–1043.

- Biadene, M., Hazemann, I., Cousido, A., Ginell, S., Joachimiak, A., Sheldrick, G. M., Podjarny, A. & Schneider, T. R. (2007). Acta Cryst. D63, 665– 672.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B. & Gabbay, K. H. (1989). J. Biol. Chem. 264, 9547–9551.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. & Thompson, J. D. (2003). Nucleic Acids Res. 31, 3497–3500.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). Acta Cryst. D50, 760–763.
- Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). J. Appl. Cryst. 30, 211-237.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). J. Appl. Cryst. 24, 409-411.
- Jez, J. M., Flynn, T. G. & Penning, T. M. (1997). Biochem Pharmacol. 54, 639–647.
- Jez, J. M. & Penning, T. M. (2001). Chem. Biol. Interact. 130-132, 499-525.
- Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). Protein Sci. 12, 1865-1871.
- Keegan, R. M. & Winn, M. D. (2007). Acta Cryst. D63, 447-457.
- Lee, S. P. & Chen, T. H. (1993). Plant Physiol. 101, 1089-1096.
- Matthews, B. W. (1968). J. Mol. Biol. 33, 491-497.
- Mundree, S. G., Whittaker, A., Thomson, J. A. & Farrant, J. M. (2000). *Planta*, **211**, 693–700.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Acta Cryst. D53, 240–255.
- Navaza, J. (1994). Acta Cryst. A50, 157-163.
- Pace, C. N. & Schmid, F. X. (1997). Protein Structure: A Practical Approach, 2nd ed, edited by T. E. Creighton, pp. 253–259. New York: IRL Press.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85, 2444– 2448.
- Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C., Arruda, P., Leite, A. & Craievich, A. (1998). Nucl. Instrum. Methods A, 405, 159–164.
- Roncarati, R., Salamini, F. & Bartels, D. (1995). Plant J. 7, 809-822
- Rondeau, J. M., Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J. M., Barth, P., Biellmann, J. F. & Moras, D. (1992). *Nature (London)*, 355, 469–472.
- Schwarzenbacher, R., Godzik, A., Grzechnik, S. K. & Jaroszewski, L. (2004). Acta Cryst. D60, 1229–1236.
- Sree, B. K., Rajendrakumar, C. S. V. & Reddy, A. R. (2000). Plant Sci. 160, 149–157.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V. & Bhatnagar, A. (2005). *Endocr. Rev.* 26, 380–392.
- Ueda, H., Kawanishi, K. & Moriyasu, M. (2004). Biol. Pharm. Bull. 27, 1584– 1587.
- Urzhumtsev, A., Tête-Favier, F., Mitschler, A., Barbanton, J., Barth, P., Urzhumtseva, L., Biellmann, J. F., Podjarny, A. & Moras, D. (1997). *Structure*, 5, 601–612.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). J. Appl. Cryst. 30, 1022-1025.
- Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H. & Quiocho, F. A. (1992). Science, 257, 81–84.
- Winn, M., Dodson, E. J. & Ralph, A. (1997). Methods Enzymol. 277, 620-633.

International Journal of Molecular Sciences

ISSN 1422-0067 www.mdpi.org/ijms

Article

Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from *B. Jararacussu*

Marcelo L. dos Santos ¹, Fábio H. R. Fagundes ², Bruno R. F. Teixeira ¹, Marcos H. Toyama ³ and Ricardo Aparicio ^{1,*}

¹ Laboratório de Biologia Estrutural e Cristalografia, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

² Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

³ Laboratório de Química de Macromoléculas, UNESP/CLP, São Vicente-SP, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: aparicio@iqm.unicamp.br.

Received: 4 February 2008; in revised form: 6 March 2008 / Accepted: 22 March 2008 / Published: 8 May 2008

Abstract: BjVIII is a new myotoxic Lys49-PLA2 isolated from *Bothrops jararacussu* venom that exhibits atypical effects on human platelet aggregation. To better understand the mode of action of BjVIII, crystallographic studies were initiated. Two crystal forms were obtained, both containing two molecules in the asymmetric unit (ASU). Synchrotron radiation diffraction data were collected to 2.0 Å resolution and 1.9 Å resolution for crystals belonging to the space group $P2_12_12_1$ (a = 48.4 Å, b = 65.3 Å, c = 84.3 Å) and space group $P3_121$ (a = b = 55.7 Å, c = 127.9 Å), respectively. Refinement is currently in progress and the refined structures are expected to shed light on the unusual platelet aggregation activity observed for BjVIII.

Keywords: Lys49-PLA2; *Bothrops jararacussu*; platelet aggregation; phospholipase crystallographic analysis

1. Introduction

Phospholipases A2 (PLA2; EC 3.1.1.4) are a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 ester bond of phospholipids to release free fatty acids, including arachidonic acid [1]. In addition to its enzymatic function, snake venom PLA2 can be neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic [2]. Many of

these properties are conferred by regions of the structure not involved in catalysis, as illustrated by the myotoxicity of the minimally catalytically active subgroup of PLA2 homologues, that possess a lysine at position 49 in the amino acid sequence (Lys49-PLA2) [3, 4].

Snake venom components can also affect the homeostatic system by the inhibition or potentiation of some physiological events associated with blood coagulation. These components usually belong to various families such as serine proteases, metalloproteinases, C-type lectins, disintegrins and phospholipases A2 [5]. At the present time, PLA2s can be classified into three different groups according to their effect on blood coagulation. The first group includes PLA2s that induce platelet aggregation; the second group acts as physiological agonists of platelet aggregation and the third group is characterized by a biphasic response on platelet aggregation (pro- and anti-aggregation properties) [6]. In the case of PLA2s isolated from the Bothrops genus, only enzymatically active phospholipases with an aspartic acid at position 49 (Asp49-PLA2), such as BhtX-II, have been characterized as potent activators of platelet reactions [7]. Its platelet aggregation activity involves cellular signaling activation, including protein kinase C, adenylyl cyclase activation pathways and also thromboxane A2 formation in the primary reaction [7]. Several enzymatically active PLA2s have been characterized as strong anticoagulant compounds as previously described by Magro *et al.* [8] and Higuchi *et al.* [2]. From the primary structure point of view, all these proteins are enzymatically active Asp49-PLA2s.

Here, we present a new pro-platelet aggregation non-catalytically active Lys49-PLA2 isolated from the *Bothrops jararacussu* venom, which will be referred to as BjVIII. Interestingly, similarly to other Lys49-PLA2s, BjVIII does not present significant enzymatic activity but, at the same time, it is able to induce a strong platelet aggregation typical of enzymatically active Asp49-PLA2s. This unusual behavior suggests the existence of regions in the protein structure, distinct from the active site, related to platelet aggregation activity.

This work describes the isolation of BjVIII from *B. jararacussu* venom and its characterization with respect to its unexpected platelet agreggation activity. In addition, a preliminary X-ray diffraction analysis of BjVIII in two different crystal forms is presented. The refined structures are expected to shed light on the unusual properties observed for this new Lys49-PLA2.

2. Materials and methods

2.1. Protein purification

BjVIII was purified from *Bothrops jararacussu* whole venom by a two-step chromatographic procedure according to the methods described by Toyama *et al.* [9] and Fonseca *et al.* [10]. Initially, 10 mg of the crude venom was dissolved in 250 μ L loading buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.0) and centrifuged at 4500 x g for 5 minutes. The supernatant was injected into a BioSuite Q AXC ion exchange column (Waters). Fractions were eluted with a gradient of a buffer containing 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, with increasing concentrations of 1.0 M NaCl (0-100%) at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. All fractions were collected and individually analyzed for myotoxicity, phospholipasic A2 activity and by tricine SDS-PAGE following the method described by Schägger & von Jagow [11]. The BjVIII fractions obtained in the first chromatographic step were dissolved in 250 μ L of an aqueous solution containing 0.15% trifluoroacetic acid. The supernatants were injected into a X-Terra C18 analytical reverse phase column, followed by elution with a mobile phase of 0.15% aqueous trifluoroacetic acid with increasing quantities of 66% acetonitrile (0-100%). The degree of purity of BjVIII was assessed by SDS-PAGE.

2.2. Platelet aggregation assays

Human venous blood was collected with informed consent from healthy volunteers who denied taking any medication in the previous 14 days. Blood was collected by a two-syringe technique using polypropylene syringes with 19-gauge needles, and immediately transferred into polypropylene tubes previously containing 1/10th of the tube final volume of 3.8% trisodium citrate. Initially, whole blood was centrifuged to obtain the platelet-rich plasma (PRP) and, after removing the PRP, the remaining blood was centrifuged at 3000 x g for 5 minutes to obtain washed platelet. The platelet aggregation assays were conducted with a washed platelet preparation that was left for 1 h at room temperature to recover its sensitivity to aggregation agents. Platelet counts were performed on a Coulter S Plus (Coulter Electronics) and by phase-contrast microscopy. Platelet aggregation was measured turbidimetrically using a dual-channel whole blood Lumi-aggregometer (Chrono Log Corporation). Platelets suspended in a phosphate buffered saline buffer (400 μ L) were pre-incubated at 37°C for 2 minutes under stirring with 1 mM CaCl₂ (final concentration) and challenged with BjVIII or other proteins in the presence or absence of inhibitors. The aggregation was recorded after 7 minutes from the application of the toxins.

2.3. Crystallization experiments

The lyophilized sample of native BjVIII was dissolved in ultra-pure water at a concentration of 10 mg mL⁻¹. Crystallization conditions were initially screened by the hanging-drop vapour-diffusion method [12] at 20°C using the Crystallization Basic and Extension Kits for Proteins (Sigma-Aldrich). Crystallization drops were prepared by mixing 2 μ L of protein solution and an equal volume of the precipitant solution, and equilibrated against 500 μ L of the same precipitant solution using 24-well tissue culture test plates (TPP). Small crystals were found in condition number 40 of the Crystallization Basic Kit (0.1 M sodium citrate, pH 5.6, 20% v/v 2-propanol and 20% w/v PEG 4000) and in number 26 of the Crystallization Extension Kit (0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES, pH 6.5 and 30% w/v PEG MME 5000). These initial crystallization conditions were refined (section *Results and discussion*) and better crystals, suitable for data collection, were obtained.

2.4. X-ray data collection and processing

Crystals were cryoprotected using reservoir solution supplemented with 20% v/v ethylene glycol and rapidly frozen in a nitrogen-gas stream (Oxford Cryosystems). X-ray diffraction data were collected at the wavelength of 1.425 Å at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brazil, beamline D03B-MX1 [13, 14], using a MAR CCD 165 detector (MAR Research). Diffraction data were integrated with *MOSFLM* [15] and scaled using *SCALA* [16]. Structures of BjVIII in both crystal forms were solved by the Molecular Replacement method using the program package *AMoRe* [17], calculations were carried out using a resolution range of 15.0-4.0 Å and default parameters. Structural superpositions

were done with *SUPCOMB* [18]. Further analyses were performed using programs from the *CCP4* suite [19, 20].

3. Results and discussion

3.1. Purification of Lys49-PLA2 BjVIII

Bothrops toxin I (BthTx-I) was the only Lys49-PLA2 purified from *Bothrops jaracussu* venom by one chromatographic step [21]. We modified the original protocol, using a two-step chromatographic procedure (section *Materials and methods*) and observed that BthTx-I fraction from the one-step protocol is composed of two closely related isoforms. This new BthTx-I-like isoform was referred to as BjVIII. Chromatographic integration indicates that, BthTx-I and BjVIII account for approximately 26% and 11% of whole venom, respectively (Figure 1).

The BjVIII fraction was collected and an aliquot of this fraction was submitted to a treatment with 1 M DTT; this sample is referred to as BjVIIIr. Native BjVIII and BjVIIIr were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions and revealed the presence of a single protein band in both cases (Figure 1b). Native BjVIII showed a molar mass of approximately 29 kDa, while the protein subjected to the treatment with DTT showed a molar mass of approximately 14 kDa, corresponding to the dimeric and monomeric BjVIII forms, respectively. The same behavior, under similar conditions, was observed for another Lys49-PLA2 isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom [22]. These results indicate that BjVIII probably assumes a dimer-like structure in solution, as verified for some other Lys49-PLA2s homologues by electrophoretic, spectroscopic and small angle X-ray scattering (SAXS) studies [23, 24].

3.2. Atypical platelet aggregation activity of BjVIII

A detailed biochemical characterization of BjVIII will be published elsewhere (Fagundes *et al.*, to be published). Similarly to other Lys49-PLA2s, such as PrTx-I, PrTx-II [25] and BthTx-I [21], BjVIII does not show significant enzymatic activity and induces similar myonecrosis as BthTx-I, when assayed at the same conditions as Barbosa *et al.* [26]. However, an atypical effect presented by BjVIII, and not by other Lys49-PLA2s, is a strong human platelet aggregation activity. We observed that BjVIII induced a dose dependent platelet aggregation, while BthTx-I, PrTx-I and PrTx-II induced a slight and marginal effect. Doses of 1 μ g, 3 μ g, 9 μ g and 12 μ g of BjVIII induced, after a time course of 7 minutes, [6 \pm 2]%, [19 \pm 5]%, [33 \pm 4]% and [83 \pm 7]% of platelet aggregation (n = 6), respectively. On the other hand, doses of 12 μ g of PrTx-I, PrTx-II and BthTx-I induced a platelet aggregation of [12 \pm 5]%, [8 \pm 2]% and [21 \pm 6]%, respectively (Fagundes *et al.*, to be published).

In platelets previously incubated with 10 μ M of arachidonyltrifluoromethyl ketone (AACOF3), a cytosolic phospholipase A2 inhibitor, BjVIII (12 mg) induced a platelet aggregation of $[29 \pm 4]\%$ (n = 6). Under the same experimental conditions, other aliquots of platelets were incubated with 10 μ M of verapamil, for 5 minutes, before the PLA2 addition (12 μ g), inducing a platelet aggregation of [12 \pm 5]% (n = 6). The platelet aggregation effect induced by BjVIII was also strongly decreased by the addition of (10 μ M) nifidipine: [8 \pm 2]% (n = 6) (Figures 2a and 2b).



Figure 1. a) Ion exchange chromatograph of *Bothrops jaracussu* venom, where Bj-VII (BthTx-I) represents the main myotoxic Lys49-PLA2 and BjVIII is a novel PLA2. b) Reverse phase chromatograph of BjVIII PLA2. The insert shows the tricine SDS-PAGE electrophoresis of native BjVIII and BjVIII treated with 1 M DTT (BjVIIIr). The dashed line in a) represents the gradient of buffer containing 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, to which 1.0 M NaCl is added, while the dashed line in b) shows the increasing concentrations of 66% acetonitrile added to aqueous 0.15% trifluoroacetic acid (solution B).



Figure 2. Platelet aggregation activity presented by BjVIII (12 μ g). In a) and b), effect of the specific PLA2 inhibitor arachidonyltrifluoromethyl ketone (AACOF3) and calcium ion blockers Nifidipine and Verapamil on platelet aggregation. In c) and d), effect the pre-treatment of BjVIII with Aristolochic acid (Aris Acid), *p*-BPB and Indomethacin.

Our results clearly show that specific inhibition with AACOF3 has an important role in platelet aggregation induced by BjVIII. Kramer *et al.* [27] demonstrated that thrombin activates cytosolic PLA2 by promoting an increase in Ca^{2+} influx, which significantly increases the cytosolic calcium concentration. A common event associated to the signal transduction cascade, that occurs during platelet aggregation by thrombin, ADP or collagen, involves phosphorylation of specific proteins, such as mitogen-activated protein and endogenous membrane PLA2 enzyme, which can, in turn, hydrolyze arachidonic acid, forming thromboxane A2, a known activator of platelet aggregation [7, 28].

In addition, three different aliquots of BjVIII, with 12 μ g each, were incubated with aristolochic acid sodium salt (Aris Acid), *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPB) and indomethacin. The chemical treatment of BjVIII with Aris Acid and with *p*-BPB induced a platelet aggregation of $[52 \pm 4]\%$ and $[43 \pm 4]\%$ (*n* = 6), respectively. Previous incubation with 1 mM indomethacin for 5 minutes did not have any significant effect on the platelet aggregation activity of BjVIII (Figures 2c and 2d).

The treatment of BjVIII with *p*-BPB significantly decreased the platelet aggregation induced by native BjVIII. *p*-BPB is commonly used for alkylation of histidine residues of enzymatically active PLA2s, without modifying other residues present in the polypeptide chain of such enzymes. Alkylation of Lys49-PLA2 myotoxins from *Bothrops pirajai* reduced myotoxicitiy by 40-50% and edema-inducing activity by 15-20%, without significantly changing their ability to disrupt negative liposomes [25, 29]. Aristolochic acid has been characterized as a specific inhibitor of secretory PLA2 and its mode of action, by its ability to enter the substrate binding hydrophobic channel of PLA2 [30]. Treatment of BjVIII toxin with Aris Acid also moderately decreased platelet aggregation induced by this PLA2.

Historically, it was believed that PLA2s exert their pharmacological effects through hydrolysis of cellular phospholipids. However, attempts to correlate these effects with catalytic activity of PLA2s were unsuccessful [31]. Furthermore, there are several catalytically inactive PLA2s which present pharmacological effects [32, 33]. Structure-function studies by chemical modification of amino acids, structural comparison of catalytically and non-catalytically active PLA2s, and use of PLA2 antibodies have suggested the presence in PLA2s of pharmacological domains distinct from the catalytic site [31, 34, 35]. Some years ago, Kini & Evans proposed a model to explain different pharmacological effects of PLA2s [31]. This model was based on the presence of specific binding sites located on the surface of target cells which have high affinities only for toxic PLA2s. Subsequent to this primary binding step, the toxic PLA2s would induce its pharmacological effect by mechanisms either dependent on or independent of phospholipid hydrolysis.

These platelet aggregation activity results point to the existence of molecular regions, distinct from the active site, responsible, at least partially, for pharmacological properties of BjVIII. Crystallographic characterization of BjVIII should provide detailed structural information that is expected to shed light on the paradoxical behavior for this type of PLA2.

3.3. Preliminary X-ray diffraction analysis

Two crystal forms were obtained after refinement of the initial crystallization conditions. A first crystal form grown from a solution containing 0.1 M sodium citrate, pH 8.5, 20% v/v 2-propanol and 18% w/v PEG 4000, belongs to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters a = 48.4 Å,



Figure 3. Crystals of BjVIII obtained using the hanging-drop vapour-diffusion method. a) $P2_12_12_1$ crystal form and b) $P3_121$ crystal form. Images were recorded using polarized light.

b = 65.3 Å, c = 84.3 Å (Figure 3a).

A second crystal form, belonging to the trigonal space group $P3_121$ with cell-dimensions a = b = 55.7 Å, c = 127.9 Å, was obtained from a solution containing 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES, pH 8.0 and 28% w/v PEG MME 5000 (Figure 3b). Both crystals forms grew within approximately 2 weeks.

X-ray diffraction data were collected using an oscillation range of 1° and 0.4° to a maximum resolution of 2.0 Å and 1.9 Å for the orthorhombic and trigonal crystals, respectively (Figure 4). Crystal parameters and data-collection statistics are summarized in Table 1. Calculations using the Matthews coefficient [36] suggested the presence of two molecules per ASU for both crystal forms. The primary sequence search and alignments were made using *ENTREZ* and *BLAST* [37]. The complete amino acid sequence of BjVIII comprises 121 amino acid residues (~13.6 kDa; Fagundes *et al.*, to be published).

A *BLAST* search against the PDB database showed that BjVIII has an amino acid sequence identity of 98% with BnSP-7 PLA2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Therefore, the 2.2 Å resolution BnSP-7 crystal structure (PDB code 1PA0) [38] was used for Molecular Replacement in both crystal forms of BjVIII.

The BnSP-7 crystal structure belongs to the space group $P_{3_1}2_1$, with two monomers in the ASU. In the case of the BjVIII crystal belonging to the trigonal space group, a single clear molecular replacement solution was found using the BnSP-7 ASU dimer (chains A and B) as a search model, with a correlation coefficient of 66.3% and R factor of 38.8% after fitting. However, for the BjVIII orthorhombic crystal, this procedure was not successful, suggesting a different molecular arrangement in the ASU. For this reason, the phase problem in the space group $P_{2_1}2_{1_2}$ was solved in a two step Molecular Replacement procedure, where the two molecules present in the ASU, anticipated by the solvent content analysis, were found using the chain A of the BnSP-7 model as a search model. After fitting, an overall correlation coefficient of 62.4% and an R factor of 39.1% were obtained.

In both crystal forms of BjVIII, a dimer is present in the ASU. In order to investigate structural differences in the molecular arrangement of the ASU contents, a superposition was carried out. A single chain of each dimer (space groups $P_{3_1}21$ and $P_{2_1}2_{1_2}1_{2_1}$) was chosen to calculate the transformation matrix, which was subsequently applied to the entire dimer. The superposition is illustrated in Figure 5.



Figure 4. Typical diffraction images with resolutions circles drawn at 2.0 Å, 2.7 Å, 4.0 Å, 8.0 Å resolution for the $P2_12_12_1$ space group and 1.9 Å, 2.5 Å, 3.7 Å, 7.4 Å resolution for the $P3_121$ space group. a) A 1° oscillation frame from $P2_12_12_1$ crystal form and b) a 0.4° oscillation frame from $P3_121$ crystal form. A close-up of the outer edge including diffraction spots with their respective indices *hkl* is also shown.

Crystal form	Orthorhombic	Trigonal
Wavelength used (Å)	1.425	1.425
Space group	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P3_{1}21$
Unit-cell parameters		
a (Å)	48.4	55.7
b (Å)	65.3	55.7
<i>c</i> (Å)	84.3	127.9
Unit-cell volume (Å ³)	266666.7	344131.9
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2.44	2.10
Solvent content (%)	49.69	41.53
ASU contents (molecules)	2	2
Resolution range (Å)	84.2-2.0 (2.1-2.0)	48.3-1.9 (2.0-1.9)
No. of images	197	237
No. of measured reflections	136881 (14411)	103843 (11729)
No. of unique reflections	19116 (2226)	20906 (2525)
Completeness (%)	96.5 (78.6)	97.2 (81.8)
Multiplicity	7.2 (6.5)	5.0 (4.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	20.0 (4.6)	22.5 (6.4)
R_{merge}^{\dagger} (%)	7.9 (35.4)	4.9 (17.7)

Table 1. Crystal parameters and X-ray data-collection statistics. Values in parentheses refer to the last resolution shell.

 ${}^{\dagger}R_{merge} = \sum_{\mathbf{h}} \sum_{l} |I_{\mathbf{h}l} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_{l} \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$, where $I_{\mathbf{h}l}$ is the *l*th observation of reflection **h** and $\langle I_{\mathbf{h}} \rangle$ is the weighted average intensity for all observations *l* of reflection **h**.



Figure 5. Stereo view of the superposition of the dimers present in the ASU of BjVIII crystals (space groups $P_{3_1}21$ and $P_{2_1}2_{1_2}2_{1_1}$). The models shown were built from the search models after application of the molecular replacement solutions, as described in text. The transformation matrix calculated from the superposition of chain A in space group $P_{2_1}2_{1_2}2_{1_1}$ onto the corresponding chain in space group $P_{3_1}21$ (fixed) was applied subsequently to the entire dimer present in the ASU of space group $P_{2_1}2_{1_2}2_{1_1}$. After transformation, chain A coordinates are coincident and, for clarity, for the space group $P_{2_1}2_{1_2}2_{1_1}$ only the chain B is shown (colored in green). The entire dimer of the space group $P_{3_1}21$ is shown in gray. The figures were prepared using *PyMOL* (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://pymol.sourceforge.net) and edited with *GIMP* (http://www.gimp.org) under Linux.

As expected, the molecules present in the ASU of the orthorhombic space group are arranged in a slightly different manner from those in the space group $P3_121$.

4. Concluding remarks

A novel non-catalytically active Lys49-PLA2, BjVIII, was purified to a high degree using two chromatographic steps. Electrophoretic analysis indicated that native BjVIII is dimeric in solution, similar to other Lys49-PLA2 homologues. We verified through pharmacological assays that BjVIII presents an atypical effect on human platelet aggregation for the Lys49-PLA2 family. We also have established crystallization conditions for two crystal forms of native BjVIII. The ASU in both space groups, $P3_121$ and $P2_12_12_1$, can accommodate two molecules, however, in a different arrangement as observed from a comparison of the Molecular Replacement solutions. Complete model building and crystallographic refinement of both structures are currently in progress. The results of this study should provide detailed information about structural features of BjVIII, possibly related to the strong human platelet aggregation activity unusual for this type of PLA2.

5. Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Crystallographic data was collect at LNLS under proposal D03B-MX1-6352. We are also grateful to Prof. Carol Collins (IQ/Unicamp) for carefully reading the manuscript and assistance with language revision.

References

- 1. van Deenen, L.; de Haas, G.; Heemskerk C. H.. Hydrolysis of synthetic mixed-acid phosphatides by phospholipase A from human pancreas. *Biochim Biophys Acta* **1963**, *67*, 295–304.
- Higuchi, D. A.; Barbosa, C. M. V.; Bincoletto, C.; Chagas, J. R.; Magalhaes, A.; Richardson, M.; Sanchez, E. F.; Pesquero, J. B.; Araujo, R. C.; Pesquero, J. L.. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from Bothrops leucurus (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie* 2007, *89*, 319–328.
- Maraganore, J. M.; Merutka, G.; Cho, W.; Welches, W.; Kézdy, F. J.; Heinrikson, R. L.. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem* 1984, 259, 13839–13843.
- 4. Nakai, M.; Nakashima, K. I.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; Hattori, S.; Chang, C. C.; Ohno, M.. Purification and primary structure of a myotoxic lysine-49 phospholipase A2 with low lipolytic activity from Trimeresurus gramineus venom. *Toxicon* **1995**, *33*, 1469–1478.
- 5. Koh, D. C. I.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K.. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 3030–3041.
- Andrião-Escarso, S. H.; Soares, A. M.; Fontes, M. R. M.; Fuly, A. L.; Corrêa, F. M. A.; Rosa, J. C.; Greene, L. J.; Giglio, J. R.. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from Bothrops jararacussu snake venom.

Biochem Pharmacol 2002, 64, 723-732.

- Fuly, A. L.; Soares, A. M.; Marcussi, S.; Giglio, J. R.; Guimarães, J. A.. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from Bothrops jararacussu snake venom. *Biochimie* 2004, *86*, 731–739.
- Magro, A. J.; Murakami, M. T.; Marcussi, S.; Soares, A. M.; Arni, R. K.; Fontes, M. R. M.. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 323, 24–31.
- Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G.; Boschero, A. C.. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 2000, *1474*, 56–60.
- Fonseca, F. V.; Antunes, E.; Morganti, R. P.; Monteiro, H. S. A.; Martins, A. M. C.; Toyama, D. O.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin Crotalus durissus cascavella venom. *Protein J* 2006, 25, 183–192.
- 11. Schägger, H.; von Jagow, G.. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987**, *166*, 368–379.
- 12. McPherson, A.. Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **1990**, *189*, 1–23.
- Polikarpov, I.; Oliva, G.; Castellano, E. E.; Garratt, R. C.; Arruda, P.; Leite, A.; Craievich, A.. The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source. *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 1998, 405, 159–164.
- Polikarpov, I.; Perles, L. A.; de Oliveira, R. T.; Oliva, G.; Castellano, E. E.; Garratt, R. C.; Craievich, A.. Set-up and Experimental Parameters of the Protein Crystallography Beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J Synchrotron Radiat* 1998, *5*, 72–76.
- 15. Leslie, A. G. W.. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, *62*, 48–57.
- 16. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, 62, 72–82.
- 17. Navaza, J.. Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1367–1372.
- 18. Kozin, M. B.; Svergun, D. I.. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Crystallogr* **2001**, *34*, 33–41.
- 19. CCP4. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1994**, *50*, 760–763.
- 20. Winn, M.; Dodson, E. J.; Ralph, A.. Collaborative computational project, number 4: Providing programs for protein crystallography. *Methods Enzymol* **1997**, *277*, 620–633.
- 21. Spencer, P. J.; Aird, S. D.; Boni-Mitake, M.; Nascimento, N.; Rogero, J. R.: A single-step purification of bothropstoxin-1. *Braz J Med Biol Res* **1998**, *31*, 1125–1127.
- 22. Soares, A. M.; Guerra-Sá, R.; Borja-Oliveira, C. R.; Rodrigues, V. M.; Rodrigues-Simioni, L.;

Rodrigues, V.; Fontes, M. R. M.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M.; Giglio, J. R.. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom. *Arch Biochem Biophys* **2000**, *378*, 201–209.

- Arni, R. K.; Ward, R. J.; Gutiérrez, J. M.; Tulinsky, A.. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1995, *51*, 311–317.
- Murakami, M. T.; Viçoti, M. M.; Abrego, J. R. B.; Lourenzoni, M. R.; Cintra, A. C. O.; Arruda, E. Z.; Tomaz, M. A.; Melo, P. A.; Arni, R. K.. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. *Toxicon* 2007, *49*, 378–387.
- Toyama, M. H.; Soares, A. M.; Vieira, C. A.; Novello, J. C.; Oliveira, B.; Giglio, J. R.; Marangoni, S.. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from Bothrops pirajai snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J Protein Chem* 1998, *17*, 713–718.
- Barbosa, P. S. F.; Martins, A. M. C.; Alves, R. S.; Amora, D. N.; Martins, R. D.; Toyama, M. H.; Havt, A.; Nascimento, N. R. F.; Rocha, V. L. C.; Menezes, D. B.; Fonteles, M. C.; Monteiro, H. S. A. . The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by Bothrops moojeni Lys49 myotoxin I. *Toxicon* 2006, *47*, 831–837.
- Kramer, R. M.; Roberts, E. F.; Manetta, J. V.; Hyslop, P. A.; Jakubowski, J. A.. Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets. *J Biol Chem* 1993, 268, 26796–26804.
- 28. Puri, R. N.. Phospholipase A2: its role in ADP- and thrombin-induced platelet activation mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* **1998**, *30*, 1107–1122.
- Soares, A. M.; Andrião-Escarso, S. H.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.; Arni, R. K.; Giglio, J. R.. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from Bothrops moojeni (Caissaca) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000, 373, 7–15.
- 30. Singh, N.; Jabeen, T.; Pal, A.; Sharma, S.; Perbandt, M.; Betzel, C.; Singh, T. P.. Crystal structures of the complexes of a group IIA phospholipase A2 with two natural anti-inflammatory agents, anisic acid, and atropine reveal a similar mode of binding. *Proteins* **2006**, *64*, 89–100.
- 31. Kini, R. M.; Evans, H. J.. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* **1989**, *27*, 613–635.
- 32. Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B.. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* **1995**, *33*, 1405–1424.
- 33. Ownby, C. L.; de Araujo H. S. S.; White, S. P.; Fletcher, J. E.. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon* **1999**, *37*, 411–445.
- Yang, C. C.. In Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, Function and Mechanism; Kini, R. M., Ed.; John Wiley & Sons: UK, 1997; Chapter Chemical modification and functional sites of phospholipases A2, p 185.
- 35. Stiles, B. G.; Choumet, V.. In Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, Function and Mech-

anism; Kini, R. M., Ed.; John Wiley & Sons: UK, 1997; Chapter Antibodies studies with venom phospholipases A2, p 223.

- 36. Matthews, B. W.. Solvent content of protein crystals. J Mol Biol 1968, 33, 491–497.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, 25, 3389–3402.
- Magro, A. J.; Soares, A. M.; Giglio, J. R.; Fontes, M. R. M.. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, *311*, 713–720.

© 2008 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

A.2 – Artigos em fase final de preparação

Abstract.

Despite several available structural models of phospholipases A2 (PLA2s), the molecular mechanisms of action for a wide range of pharmacological properties of these interesting enzymes are not completely understood. In this work we present a detailed crystallographic characterization of a new Lys49-PLA2 from *Bothrops jararacussu* venom, referred to as BjVIII, which displays an unusual platelet aggregation activity. Structure was solved in two different space groups where an unexpected electron density in the active site was putatively modeled as a lysophosphatidic acid molecule to which has been attributed the atypical platelet aggregation effect. In addition, bioinformatics studies and molecular comparisons with other PLA2s have shown the evolutionary conservation of the scatelytic machinery and enabled the identification of the same myotoxic site recently proposed for Lys49-PLA2S. BjVIII crystallographic structures and model analyses performed in our studies have contributed to a better understanding of the pharmacological action of phospholipases A2.

Santos, M.L.1; Fagundes, F.H.R.2,3; Toyama, M.H.3 and Aparicio, R.1 \star

Crystallography and bioinformatics in the study of platelet aggregation and the enzymatic and myotoxic activities of BiVIII: a new PLA2 Bthtx-I-like isoform

¹Laboratory of Structural Biology and Crystallography, Institute of Chemistry, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ²Biochemistry Department, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ³Laboratory of Macromolecules Chemistry, UNESP/CLP, São Vicente, SP, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: aparicio@iqm.unicamp.br.

1. Introduction.

BjVIII is a new Lys49 Phospholipase A2 (Lys49-PLA2) that has been recently purified from the same chromatographic fraction of *Bothrops jararacussu* venom in which several so-called Bothropstoxin I (Bthtx-I) Lys49-PLA2 isoforms have been obtained¹⁻³. These Phospholipases A2 (PLA2; E.C. 3.1.1.4), enzymes that catalyze the hydrolysis of the *sn-2* ester bond of phospholipids to release unsaturated fatty acids and lysophospholipids^{4,5}, do not present significant enzymatic activity like other PLA2s. Among other hypothesis, the low hydrolytic activity of Lys49-PLA2 has been attributed to the presence of a lysine at position 49 in the amino acid sequence because the Lys side chain nitrogen atom (c-aming group of Lys49) is located in the position normally occupied by the Ca²⁺ co-factor in the enzymatically active Asp49-PLA2s, Phospholipases A2 with an aspartic acid at position 49⁶⁻¹⁰. Although amino acid sequence identity between BjVIII and

Description of the set of the

In addition to PLA2s that induce platelet aggregation, act as physiological agonists or are characterized by a biphasic respons^{14,17-19}, several snake venom components have been characterized by their action on the platelet aggregation^{20,21}, including thrombin-like pro-aggregating serine proteases²², some non-enzymatic components like C-type lectins and metalloproteinase-disintegrins²³. Phospholipiases A2 are also known for their ability to generate bioactive lysophospholipids that act as platelet-activating factors²⁴⁻²⁶. The most common lysophospholipid mediators of platelet aggregation are characterized by a glycerol or sphingoid backbone with a fatty acyl chain and a free phosphate group: lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate (SIP), respectively²⁵. These lysophospholipids activate diverse groups of G-protein-coupled receptors (GPCRs), cell surface receptors for small molecules that span the plasma membrane and signal via heterotrimeric G proteins, displaying a particular impact on cellular functions, such as platelet as glatelet aggregation activation and even in cancer growth and metastasis, LPA being one of the most important and widely sudied phospholipid metastasis.

In an earlier work we described the isolation of BjVIII, investigated the atypical platelet aggregation activity of BjVIII Key words: Protein crystallography, bioinformatics, Lys49-PLA2, platelet aggregation, enzymatic activity, myotoxic site and dimeric configuration.

2

and initiated its crystallographic characterization, aiming at understanding the molecular reasons for this unexpected pharmacological effect¹. High resolution structural model refinement revealed a completely surprising continuous electron density in the active site for the believed apoenzyme Lys49-PLA2 purified from *B. jararacussu* venom. Interpretation of this electron density led us to unveil the reason for its unusual platelet aggregation property based on the lysophosphatidic acid 1-monohexanoy1-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate descendant from the snake venom and attached in the hydrophobic substrate-binding channel. At the same time, utilization of bioinformatics tools allowed us to investigate potential BjVIII enzymatic ability like As94-PLA2s, independent of cofactor binding. These bioinformatics analysis corroborate several experimental studies in which it was observed that Lys49-PLA2s retain mechanism²⁹⁻³².

Unforeseen molecules, in general free fatty acids probably originating from the snake venom, were found bound in the active site of other Lys49-PLA23³³⁻³⁵. The observation of such lipid molecules trapped by these phospholipases has been attributed to an incomplete phospholipid hydrolysis in which there is a failure of product release, leading to enzyme inhibition and justifying the apparent low level or lack of catalytic activity for Lys49-PLA2³⁴. There are also crystallographic studies involving Lys49-PLA2³⁴. There are also crystallographic studies involving Lys49-PLA2³⁴. There are to obtain structural models for "non-natural" complexes ^{11,12,36,37}. In these cases, the mechanism of inhibition by blockage of the Lys49-PLA2s active site region involves both modification of the overall charge on dimeric interface recognition and free accessibility to the active site, assuming the dimer as the biological unit¹¹.

Additionally, a possible cooperation mechanism between Lys49 and Asp49-PLA2s was proposed in which the last enzymes catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids, releasing lysophospholipids and fatty acids; the released fatty acid would bind in the hydrophobic channel of Lys49-PLA2s, inducing structural changes (from the "inactive" to the "active state", represented by apo and complexed enzymes); and finally, the dimeric Lys49-PLA2 in the "active-state" would interact with the membrane using a suggested "myotoxic site", resulting in a better anchoring^{12,35}.

In this paper we present the crystallographic characterization of a new Lys49-PLA2 Bthtx-I-like isoform (BjVIII) in two different space groups, and bioinformatics analysis of these models, aiming to understand the reason for their unusual pro-platelt aggregation property. Based on our results and in the molecular mechanisms presented previously, we propose that this pharmacological effect is a consequence of the releasing of the unexpected lysophosphatidic acid found in the BjVIII active site. We have also investigated the potential catalytic ability of Lys49-PLA2s in comparison with Asp49-PLA2s through structural, evolutionary and physico-chemical descriptor evaluations to define the set of parameters that may represent the catalytically fundamental amino acid residues of PLA2s from different organisms.

4

2. Materials and Methods.

2.1. Structural Refinement and Models Evaluation.

Detailed methodology for the purification, biochemical assays, crystallization trials, X-ray diffraction data-collection and structure solution were published previously¹. The structure of BjVIII in two different space groups ($P2_12_12_1$ and $P3_121$) was solved by molecular replacement using the program $AMORe^{38}$. Structure refinement was performed using Refmac5³⁹ and $COOT^{40}$ with iterative adjustment of the model. Water molecules were introduced using the COOT Find Waters tool and F_o-F_o map. In order to interpret an unexpected electron density observed in the hydrophobic channel of BjVIII we have made several ligand searches in the Hic-Up⁴¹⁻⁴³ (http://rray.bmc.uu.se/hicup/) and Ligand Expo⁴⁴ (http://ligand-expo.rcsb.org/) web servers. Attempts to identify possible ions in the crystallographic models were performed using the program WASP⁴⁵ (WAter Screening Program) available in the STructure ANalysis server (STAN, http://xray.bmc.uu.se/usi/). Additional TLS⁴⁶ refinement was executed at the latest stage. The Waterid program, implemented in the CCP4 suite^{47,48}, was used to rationalise water molecules at the end of refinement. The final models' stereochemical quality was assessed with the program PROCHECK⁴⁹ and the Molprobity⁵⁰

2.2. Bioinformatics Analyses.

Structural differences between PLA2s crystallographic structures and the four chains modeled for BJVIII, two dimers, each one in a different space group, were evaluated through superpositions and RMSD statistics using a modified quaternion approach implemented in the SuperPose⁵¹ web server (http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose). The Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies service PISA⁵² at European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) web server was employed in order to evaluate the structural features of the BjVIII dimer models obtained in this work. Structural and physico-chemical descriptors of BjVIII and several other PLA2s crystallographic models were also calculated by the Blue Star STING⁵³ web server (STING, http://www.cbi.ac.utal and physico-chemical parameters that can be used to describe the special characteristics of the amino acids important to the enzymatic activity of PLA2s was identified. This procedure was performed through the same filtering out methodology employed in the interview for a Tag polymerase I, an HIV-I

5

(BjVIII + lysophospholipid) showed slight differences between the protein chains and alternative conformations for the ligand [Fig. 2].

The largest displacements between Ca positions evaluated by the SuperPose web server through root mean square deviation (RMSD \geq 1.0) were observed for the segments composed of the amino acid residues 30-31 (Ca²⁺ binding loop), 76-78 and 108-114 (C-terminal). Comparing the temperature factor (B-factor) average for these segments, 27.3 Å² and 26.5 Å² in the space groups P3.21 and P2.22.1, respectively, with those for the whole protein amino acids, 22.4 and 20.6 in the same space groups, the observed structural variation seems to be predominantly due to the larger flexibility of such regions. However, crystallographic packing analysis showed that the most group P3.21 [Fig. 3]. According to this analysis it is clear that the amino acid residues Hisl11 and Leul12 are orientated towards the hydrophobic channel of one crystal symmetry mate molecule and stabilized by hydrophobic interactions. Some authors have considered such variance in the C-terminal as the probable reason for some of the wide range of pharmacological activities observed for PLA2s⁶⁷⁻⁶⁹, but that does not seem to be the case for BiVIII

the wide range of pharmacological activities observed for PLA2s⁶⁷⁻⁶⁹, but that does not seem to be the case for BjVIII. Like other group II secretory phospholipases A2, BjVIII displays seven intramolecular disulfide bonds arranged in the 122 amino acid sequence⁷⁰. The original amino acid sequence of BjVIII been modified after electron density map (F_0 - F_c) and $2F_o$ - F_c) interpretation during the refinement stage. The 36th and 55th positions in the amino acid sequence of BjVIII were initially identified as glycine and valine, respectively, but after several refinement cycles the unequivocal presence of Ser36 and Leu55 was observed. The final BjVIII primary structure is very similar to those of Bthtx-1 isoforms (97%=99% in amino acid sequence identity), Lys36 to Ser36 (residues exposed to the solvent) being the only remarkable and conserved mutations between different Bothropstoxin I isoforms and this new Lys49=PLA2. Structural superpositions and comparison of BjVIII and Bthtx-I models focusing in this mutation did not add any substantial information in order to correlate

Isolons and this the Dyspectrum of the characteristic and superpositions and comparison of BjVIII and Bthtx-I models focusing in this mutation did not add any substantial information in order to correlate structure and function of these Lys49-PLA2s (results not shown). An extensive search for Na⁺, NH₄⁺, Li⁺, F⁻, Mg²⁺ and Ca²⁺ ions was performed using the programs WASP and XFAND, but without any positive hit. All atoms different from the protein amino acids and ligands were modeled as water molecules that were arranged according protein chains proximity at the end of the refinement by the program Watertidy. An interesting pattern of water clusters showing a highly organized pentagonal distribution was found on the outside of the BjVIII hydrophobic channel [Fig. 4]. Most probably such formations correspond to ice nucleation established through hydrogen bonds between the water molecular region¹². Interestingly, this phenomenum has been studied and demonstrated in a highly planar Cu(110) substrate surface⁷². The same water behavior has been observed with a hydrophobic protein, crambin, where it was supposed that these water integrase and some serine proteases⁵⁴. In our studies, fifteen different crystallographic structures of PLA2s homologs found in the Protein Data Bank (PDB), ranging from 12% to 99% in sequence identity (s.i.) with BjVIII, were evaluated: lpoc.pdb from Apis mellifera venom⁵⁵ (12% s.i.), lfxf.pdb pancreatic of Sus scrofa⁵⁶ (28% s.i.), lg4i.pdb pancreatic of Bos Taurus⁵⁷ (30% s.i.), lpp2.pdb from Crotalus atrox venom⁵⁶ (44% s.i.), lbjj.pdb from Gloydius halys venom⁵⁹ (47% s.i.), lzlb.pdb from Bothrops jararacussu venom⁶¹ (50% s.i.), lkqu.pdb nonpancreatic of Hom sapiens⁶² (51% s.i.), 2qoq.pdb from Bothrops jararacussu venom⁶¹ (50% s.i.), lkqu.pdb nonpancreatic of Hom sapiens⁶² (51% s.i.), 2qod.pdb from Bothrops jararacussu venom⁶¹ (99% s.i.), 3hzd.pdb from Bothrops jararacussu venom⁶⁴ (99% s.i.), 3cxi.pdb from Bothrops jararacussu venom¹² (99% s.i.), 3cxi.pdb from Bothrops jararacussu venom. These models were determined in different "oligomeric states" in the ASU (monomeric, dimeric, tetrameric and hexameric); with and without calcium and/or ligands; corresponding to Lys49- and Asp49-PLA2s. The amino acid sequence identity between BjVIII and other PLA2s was calculated using the multiple sequence alignment program ClustalW⁶⁵.

3. Results and Discussion.

3.1. Overall Models Features.

The refined crystal structure of BjVIII from Bothrops jararacussu venom was obtained at 1.98 Å and 1.83 Å resolution for crystals belonging to the space groups P_2 ,2,1, and P_3 ,21, both containing two protein molecules in the asymmetric unit (ASU), respectively. Final models showed crystallographic ($R_{\rm vork}$) and $R_{\rm rese}$ factors of 17.3%/23.8% for the space group P_2 ,2,2, and 19.7%/26.5% for the space group P_3 ,21, without residues found in the disallowed region of the Ramachandran plot. Data collection and refinement statistics for both crystal forms are summarized in Table I. Besides the two protein density observed near the active site region was putatively modeled as a lysophospholipid molecule, which will be used in further discussion. Several components of the crystallization solutions (sulfate ion, citrate ion, ethylene glycol and isopropyl alcohol) were also modeled in the final structures [Fig. 1].

Crystallographic models of BjVIII obtained after structural refinement present the same canonical fold for a class II PLA2: an N-terminal α -helix (α l); a relatively long loop segment containing the calcium-binding site (Ca²⁺ loop); a pair of large, nearly parallel α -helices (α 2 and α 3) that, together with α l, compose the hydrophobic channel; and a short antiparallel double-stranded β -sheet^{6,66}. In addition to these conserved three-dimensional structural motifs, one lysophospholipid molecule was modeled attached in the hydrophobic channel for each chain (A and B) of the dimer in both space groups (P2₁2₁ an P3₂21). Notwithstanding, structural superposition of each of the four complexes in the ASU

molecules in a pentagonal arrangement might be related to the protein folding $\operatorname{process}^{73}.$

3.2. Assemblies and Myotoxicity.

In addition to the enzymatic function, phospholipases A2 from snake venoms are regularly neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic⁷⁴⁻⁷⁷, as illustrated by some myotoxic Lys49-PLA2s including BjVIII^{1,78}. Recently, it was proposed through several Lys49-FLA2 crystallographic model analyses (Apo and complexed with ligands) that the myotoxic site of these proteins comprises the amino acid residues Lys20, Lys115 and Arg118¹². In this study a common dimer conformation, referred as conventional dimer, was identified, which has been considered the biological unit. Besides crystallographic characterization, electrophoretic, spectroscopic and small angle X-ray scattering (SAXS) studies showed that BjVIII and other Lys49-FLA2s probably assume a dimer-like structure in solution^{1,9,11,32}. SAXS characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus cascavella* venom also demonstrated that Asp49-FLA2s must assume this dimeric onfiguration in solution (to be published).

dimeric configuration in solution (to be published). Although BjVIII "dimers" in the ASU of P3₂(21 and P2₁2₁; crystal forms do not correspond to the so called conventional dimer, bioinformatics analyses of BjVIII models in the Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (PISA) web service indicated that the most probable quaternary structure for BjVIII in solution is a dimeric configuration different from the asymmetric unit contents. According to the highest PISA complexation significance score, BjVIII dimers in solution are composed by chain A of the ASU content and chain B after a certain application of symmetry operations corresponding to the respective space groups. The same evaluation has shown that the dimer formed by BjVIII chains in the P2₁2₁, pace group is the most stable in solution according to the number of interface forming residues, area parameters and Gibbs dissociation energies [Table II].

Molecular superposition of PISA BjVIII assemblies onto the Bthx-I "conventional dimer", representative of the biological unit of Lys49-PLA2s, revealed that the same amino acid residues that compose the myotoxic site of such enzymes are in the same relative orientations, despite differences due to the crystal forms of the analyzed models ($P_{21}, P_{32}(1)$ and $P_{22}(2_1)$). In the case of Bthtx-I (PDB ID 3CXI), the amino acid sequence numeration of these residues are Lys20, Lys115 and Arg118, while for BjVIII the respective amino acids are Lys20, Lys106 and Arg109. It is important to say that not only for Bthtx-I, but also for other PLA2s crystallographic models, there are some gaps in the amino acid numeration, e.g. residues number 14, 54-56, 62-66, 89 and 128 for the model $3 \operatorname{cxi.pdb}^{12}$. Independent of the numeration, the spatial arrangement of the BjVIII and Bthtx-I myotoxic site is quite similar, which can also be related to this activity for BjVIII. It is very probable that the slight displacements observed are a consequence of crystal packing since even between BjVIII in different space groups such differences are verified. Thus, it is noteworthy that, while looking for correlations between structure and activities of proteins, in the present case Lys49-PLA2s, the effects of crystal forces must be . remembered.

3.3. Unusual Platelet Aggregation Property.

An extensive biochemical characterization of the strong human platelet aggregation activity presented by BjVIII has been previously published¹. It was showed that similar to other Lys49-PLA2s, such as Prtx-I, Prtx-II⁷⁹ and Bthtx-I⁸⁰, BjVIII does not display significant catalytic function, but, at the same time, only BjVIII, and not the other Lys49-PLA2 isoforms, displays a platelet BjVIII, and not the other Lys49-PLA2 isoforms, displays a platelet aggregation property typical of enzymatically active Asp49-PLA2s, e.g. Bthtx-II¹³. Following this reasoning, we speculated the existence of molecular regions of BjVIII, distinct from the active site, responsible, at least partially, for this pharmacological activity¹. However, after crystallographic analysis of BjVIII protein chains, it became evident that the presence of the unexpected lysophospholipid molecule in the active site region must be the main reason for its atypical platelet aggregation property, instead of the slight structural differences between BjVIII and Bthtx-I isoforms, as detailed below. The putative lysophospholipid molecule modeled in the active

Bthtx-I isoforms, as detailed below. The putative lysophospholipid molecule modeled in the active site of BJVIII was identified by visual comparison through several ligand searches in the Hic-Up and Ligand Expo web servers. The continuous unexpected electron density observed in the hydrophobic substrate-binding channel was then better interpreted as the lysophosphatidic acid (LPA) 1-monohexanoy1-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (HHG, PDB three letter ligand code) [Fig. 5]. This choice was done based on the best fit of the electron density maps, biochemical implications and protein-ligand interactions. Sequential refinement steps showed that the electron density

Sequential refinement steps showed that the electron density maps corresponding to this ligand are relatively weaker in comparison with those for the polypeptide chains. In addition, the final occupancy of 0.8 set to the LPA molecule is indicative that some BjVIII molecules in the crystals are not occupied by this molecule, which can be related to the relative facility of releasing molecule, which can be related to the relative facility of releasing or low affinity for this ligand. On the other hand, the maintenance of the LPA molecule in the active site of BjVIII may be a consequence of a new role for PLA2s as carrier proteins, since the solubility of lysophospholipids in aqueous medium is relatively low (predicted water solubility of 8.94 mg/mL for 1-monohexanoy1-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate according its DrugBank card, http://www.drugbank.ca/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=DB04199). It is known that PLA2 catalytic products arachidonic acid and Uncortected in the soft according latelet agreention²⁴⁻²⁶.

lysophospholipids act as activators of platelet ${\rm aggregation}^{24-26}.$ Thus, considering these possibilities and the electron density Thus, considering these possibilities and the electron density interpretation, we believe that the unusual platelet aggregation activity of BjVIII emerges from the releasing of the lysophosphatidic acid bound in the active site and resulting from the snake venom or a product of an incomplete phospholipid hydrolysis. The presence of just a few platelet-activating factors can act as a trigger to initiate several signal transduction pathways, whose cascade culminates in platelet aggregation^{13,81}. In

9

does not seem to be fundamental for BiVIII catalytic activity and does not seem to be fundamental for EyVIII catalytic activity and also because it has been observed that other backbone amide amino acids (Tyr28, Gly32 and Gly33) are also responsible for calcium ion coordination^{59,61}. Additionally, it has been verified that in the catalytic mechanism of pancreatic sPLA2 the presence of other relatively small cations like cobalt and nickel may act in the polarization of the *sn*-2 carbonyl oxygen³⁰. For this reason, only the residues His48 and Asp99 (or equivalent residues in the PLA2s structural models but with different numeration) were taken into account in the identification of the descriptors related to the phospholipasic activity. Evolutionary conservation, hydrophobicity, phospholipasic activity. Evolutionary conservation, hydropholicity, number of 3D residue neighbors and regions extending up to 8 Å from the molecule center of mass were identified as the main characteristics that might be correlated to the catalytic activity of Lys49- and Asp49-FLA2S [Table III]. Our bioinformatics analyses indicate that BjVIII and other

Our bioinformatics analyses indicate that BjVIII and other Lys49-PLA2s (corroborating the x-ray diffraction studies that pointed to the conservation of the catalytic machinery by Lys49-PLA2s. Interpretation of the set of descriptors defined in the His48 and Asp99 filtering out process suggests that beyond being highly conserved evolutionarily, or in other words, presenting a low sequential variability evaluated through the relative entropy parameter (\leq 11 in the interval of 1-100), these catalytically important residues must be near to the core of the phospholipases A2 molecules (up to 8 Å from the center of mass, the region that comprises the hydrophobic channel), but showing a low hydrophobicity (constant ≤ -4 in the interval of -8.72 to 4.92)³². Finally, His48 and Asp99 are different residues since they are interacting with two or more 3D neighbors (LHA \geq 2) that are separated in the primary structure.

Structure. Since structurally, evolutionarily and chemically, Lys49-PLA2s seems to be able to catalyze the hydrolysis of phospholipids, but without Ca2+ or other ions polarizing the sn-2 carbonyl oxygen ester bond of the substrate, we propose that BjVIII and other Lys49-PLA2s may use an alternative route performing a less efficient catalysis, independent of cofactor binding. Some authors have been proposing Independent of cofactor binding. Some authors have been proposing that the low hydrolytic activity of Lys49-PLA2s is a consequence of the partial blockage of the PLA2-acitive site-regions by the presence of catalysis products unreleased correctly^{34,35}. Nevertheless, this does not mean that product inhibition is the only reason for the reduced activity. Whereas it is not expected that Lys49-PLA2s display the same catalytic efficiency as calcium dependent PLA2s³³, it is worth remembering that in the case of BjVIII the lysephosphatic acid attached to its hydrophobic channel might dependent PLA2s⁹³, it is worth remembering that in the case of BjVIII the lysophosphatidic acid attached to its hydrophobic channel might be the reason for the lack of observation of phospholipasic activity.

4. Concluding Remarks.

Crystallographic $\tt Bj \tt VIIII$ models obtained in this work present an unique feature that permitted the proposition of a reasonable explanation for the atypical platelet aggregation of this new Lys49the releasing process, beyond the hydrophobic interactions between

the releasing process, beyond the hydrophobic interactions between the acyl chain of the LPA and amino acid residues of the BjVIII hydrophobic channel, the hydrogen bond system that stabilizes the phosphate head and glycerol backbone must be disrupted [Fig. 6]. Platelet aggregation assays with BjVIII and employing known PLA2 inhibitors, such as arachidonyltrifluoromethyl ketone (AACOF3), aristolochic acid (Aris Acid) and p-bromophenacyl bromide (p-BPB), showed a considerable reduction of this effect after a treatment with theor substance. with these substances¹, indicating a probable releasing of LPA through dislocation of this molecule by the binding of the inhibitors, known for its ability to interact with residues of the hydrophobic channel of PLA2s^{79,82,83}.

3.4. Phospholipasic Activity.

As mentioned before, Lys49-PLA2s are enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 ester bond of phospholipids but do not present significant enzymatic activity. The low hydrolytic calcium independent activity of such enzymes has been attributed to the presence of Lys49 because the lysine nitrogen side chain atom is located in the place occupied by the Ca²⁺ ion in the enzymatically active Asp49-PLA2s. Crystallographic analysis revealed that BjVIII possess the same structural features as other secretory PLA2s (SPLA2s), including conservation of the catalytic triad (Gly30, His48 and Asp99)^{84,85}, but confirming the failure of calcium ion binding by the presence of Lys49. binding by the presence of Lys49.

binding by the presence of Lys49. Phospholipasic activity assayed in vitro using toxins extracted directly from the snake venom have demonstrated the limited catalytic activity of Lys49-PLA2s^{66,87}. These studies have been questioned because of the possible presence of trace amounts of contaminating Asp49-PLA2, sufficient to yield the low levels of activity observed³⁵. Thus, the hydrolytic activity being observed for Vid0 PU20 supple Lys49-PLA2s would be a consequence of such contamination. However, this low catalytic activity seems to be not obvious, since both Lys49-PLA2s and Asp49-PLA2s have a highly conserved catalytic machinery, as verified by several x-ray diffraction studies in which it was shown that Lys49-PLA2s conserve all the important residues of the catalytic mechanism^{6,7,9,33,88}. Using refolded recombinant Lys49-PLA2 enzymes, where the risk of contamination with Asp49-PLA2s has been eliminated, the hypothesis that Lys49-PLA2s are catalytically inactive appeared to be confirmed^{31,35,89}. All these findings point to the controversy that Lys49-PLA2s may possess residual catalytic activity. In order to address the potential catalytic ability of BjVIII

In order to address the potential catalytic ability of byvin and other Lys49-PLA2s in comparison with Asp49-PLA2s, we have employed bioinformatics analyses through structural, evolutionary and physico-chemical descriptor evaluation, with the Java Protein Dossier embedded in the Blue Star STING web server, by the definition of the set of parameters that may represent the catalytically important amino acid residues of PLA2s from different organisms.

Although for Ca²⁺ dependent Asp49-PLA2 enzymatic activity, the Gly30 carbonyl group is required for cofactor binding, this residue

10

PLA2 Bthtx-I-like isoform. The presence of an unexpected electron density modeled as a lysophosphatic acid molecule in the active site of this enzyme appears to be the main reason for BjVIII platelet aggregation activity, unusual for minimally catalytically active PLA2s. Bioinformatics studies also demonstrated that platelet aggregation activity, unusual for minimally catalytically active PLA2s. Bioinformatics studies also demonstrated that potentially Lys49-PLA2s have the same catalytic ability as Asp49-PLA2s, corroborating previous crystallographic characterizations in which the evolutionary conservation of the enzymatic machinery by these proteins was observed. Molecular comparison of the probable of BjVIII in solution with another Lys49-PLA2 has enabled the dimer of BjVIII in solution with another Lys49-PLA2 has enabled the identification of the same features supposed to be responsible for the myotoxicity of such enzymes. Nevertheless, obtaining and evaluating BjVIII structures in two different crystal forms have reinforced the necessity to distinguish the structural features possibly related to the protein function from those that are a consequence of crystal packing. Finally, our results show that Lys49-PLA2s may be able to bind not only free fatty acid molecules but also lysophospholipids, suggesting that phospholipases A2 may act as molecular carriers. The anchoring and releasing of catalysis products, and possibly other snake venom chemical species, might be an auxiliary mechanism for the wide range of pharmacological activities displayed by these intriguing enzymes.

Acknowledgements.

We gratefully acknowledge the National Laboratory of hrotron Light (LNLS) for the use of the Macromolecular Synchrotron Light Synchrotron Light (INLS) for the use of the Macromolecular Crystallography beamline under proposal D03B-MX1-6352. This work has been supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We are also grateful to Prof. Carol Collins (IQ/UNICAMP) for carefully reading the manuscript and assistance with language revision.

References.

- Santos ML, Fagundes FHR, Teixeira BRF, Toyama MH, Aparicio R. Purification and preliminary crystallographic analysis of a new Purification and preliminary crystallographic analysis o Lys49-PLA2 from B. jararacussu. Int J Mol Sci 2008;9:736-750.
- Homsi-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon 1988;26:615-627.
- Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. J Protein Chem 1993;12:57-64.
- DJ, Rodbell M, Turner LD. Enzymatic formation 4. Hanahan character in the second s
- van Deenen L, de Haas G, Heemskerk CH. Hydrolysis of synthetic mixed-acid phosphatides by Phospholipase A from human pancreas. Biochim Biophys Acta 1963;67:295-304.

- 6. Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, Ryde TJ, Einspahr HM, Finzel BC, Heinrikson RL, Watenpaugh KD. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. J Biol Chem 1990;265:17649-17656.
- Scott DL, Achari A, Vidal JC, Sigler PB. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistridon pscivorus piscivorus. J Biol Chem 1992;267:22645-22657.
- Scott DL, Sigler PB. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. Adv Protein Chem 1994;45:53-88.
- Arni RK, Ward RJ, Gutierrez JM, Tulinsky A. Structure of a calciumindependent Phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1995;51:311-317.
- Maraganore JM, Merutka G, Cho W, Welches W, Kézdy FJ, Heinrikson RL. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. J Biol Chem 1984;259:13839-13843.
- Murakami MT, Viçoti MM, Abrego JR, Lourenzoni MR, Cintra AC, Arruda EZ, Tomaz MA, Melo PA, Arni RK. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. Toxicon 2007;49:378-387.
- dos Santos JL, Soares AM, Fontes MR. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from Bothrops genus reveal their myotoxic site. J Struct Biol 2009;16:1106-116.
- Fuly AL, Soares AM, Marcussi S, Giglio JR, Guimarães JA. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochimie 2004;86:731-739.
- Fuly AL, Machado OL, Alves EW, Carlini CR. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. Thromb Haemost 1997;78:1372-1380.
- 15. Dhillon DS, Condrea E, Maraganore JM, Heinrikson RJ, Benjamin S, Rosenberg P. Comparision of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipases A2 from Agkistrodon piscivorus piscivorus snake venom. Biochem Pharmacol 1987;36:1723-1730.
- Condrea E. Comparision of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phopholipases A2 from Agkistrodon piscivorus piscivorus snake venom. A reconsideration. Toxicon 1989;27:705-706.
- Ouyang C, Huang TF. Effect of the purified phospholipases A2 from snake and bee venoms on rabbit platelet function. Toxicon 1984;22:705-718.

13

- 32. Ferreira TL, Ruller R, Chioato L, Ward RJ. Insights on calciumindependent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA2 using tryptophan scanning mutagenesis of Bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu. Biochimie 2008;90:1397-1406.
- 33. de Azevedo WF Jr, Ward RJ, Gutiérrez JM, Arni RK. Structure of a Lys49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of Bothrops nummifer (jumping viper). Toxicon 1999;37:371-384.
- 34. Lee WH, da Silva Giotto MT, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I, Garratt RC. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. Biochemistry 2001;40:28-36.
- 35. Ambrosio AL, Nonato MC, de Araújo HS, Arni R, Ward RJ, Ownby CL, de Souza DH, Garratt RC. A molecular mechanism for Lys49phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change. J Biol Chem 2005;280:7326-7335.
- Watanabe L, Soares AM, Ward RJ, Fontes MR, Arni RK. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A2: crystal structure of myotoxin II from Bothrops moojeni complexed with stearic acid. Biochimie 2005;87:161-167.
- Murakami MT, Arruda EZ, Melo PA, Martinez AB, Calil-Eliás S, Tomaz MA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Arni RK. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. J Mol Biol 2005;350:416-426.
- Navaza J. Implementation of molecular replacement in AMoRe. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2001;57:1367-1372.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1997;53:240-255.
- Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004;60:2126-2132.
- Kleywegt GJ, Jones TA. Databases in protein crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1998;54:1119-1131.
- 42. Kleywegt GJ, Henrick K, Dodson EJ, van Aalten DM. Pound-wise but penny-foolish: How well do micromolecules fare in macromolecular refinement? Structure 2003;11:1051-1059.
- Kleywegt GJ. Crystallographic refinement of ligand complexes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2007;63:94-100.
- Feng Z, Chen L, Maddula H, Akcan O, Oughtred R, Berman HM, Westbrook J. Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules. Bioinformatics 2004;20:2153-2155.
- Nayal M, Di Cera E. Valence screening of water in protein crystals reveals potential Na⁺ binding sites. J Mol Biol 1996;256:228-234.
- Winn MD, Murshudov GN, Papiz MZ. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. Methods Enzymol 2003;374:300-321.

- Kini RM, Evans HJ. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by Phospholipase A2 isoenzymes from Naja nigricollis venom. Toxicon 1995/3311585-1590.
- 19. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MR, Fuly AL, Corrêa FM, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR. Structural and function characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochem Pharmacol 2002;64:723-732.
- Kini RM, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. Toxicon 1990;28:1387-1422.
- Koh DC, Armugam A, Jevaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci 2006;63:3030-3041.
- 22. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? Biochim Biophys Acta 2001;1547:183-195.
- Wijeyewickrema LC, Berndt MC, Andrews RK. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. Toxicon 2005;45:1051-1061.
- Gerrard JM, Robinson P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. Biochem Biophys Acta 1989;1001:282-285.
- Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: signaling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. Biochem Biophys Acta 2007;1766:923-940.
- Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J Biol Chem 1979;254:9355-9358.
- Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. J Biol Chem 1995;270:12949-12952.
- Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:582-591.
- 29. Rufini S, Cesaroni P, Desideri A, Farias R, Gubensek F, Gutiérrez JM, Luly P, Massoud R, Morero R, Pedersen JZ. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. Biochemistry 1992;31:12424-12430.
- Pedersen JZ, de Arcuri BF, Morero RD, Rufini S. Phospholipaselike myotoxins induce rapid membrane leakage of non-hydrolyzable ether-lipid liposomes. Biochim Biophys Acta 1994;1190:177-180.
- 31. Ward RJ, de Oliveira AH, Bortoleto RK, Rosa JC, Faça VW, Greene LJ. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expression Furif 2001;21:134-140.

14

- Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1994;50:760-763.
- Dodson EJ, Winn M, Ralph A. Collaborative Computational Project, number 4: providing programs for protein crystallography. Methods Enzymol 1997;277:620-633.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Cryst 1993;26:283-291.
- 50. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3^{rd} , de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. Structure validation by C\alpha geometry: $\phi, \, \psi$ and CGeviation. Proteins 2003;50:437-450.
- Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, Wishart DS. SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. Nucleic Acids Res 2004;32:W590-594.
- Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J Mol Biol 2007;372:774-797.
- 53. Neshich G, Mazoni I, Oliveira SR, Yamagishi ME, Kuser-Falcão PR, Borro LC, Morita DU, Souza KR, Almeida GV, Rodrigues DN, Jardine JG, Togawa RC, Mancini AL, Higa RH, Cruz SA, Vieira FD, Santos EH, Melo RC, Santoro MM. The Star STING server: a multiplatform environment for protein structure analysis. Genet Mol Res 2006;5:171:722.
- 54. Neshich G, Rocchia W, Mancini AL, Yamagishi ME, Kuser PR, Fileto R, Baudet C, Pinto IP, Montagner AJ, Palandrani JF, Krauchenco JN, Torres RC, Souza S, Togawa RC, Higa RH. JavaProtein Dossier: a novel web-based data visualization tool for comprehensive analysis of protein structure. Nucleic Acids Res 2004;32:w595-601.
- Scott DL, Otwinowski Z, Gelb MH, Sigler PB. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. Science 1990;250:1563-1566.
- 56. Pan YH, Epstein TM, Jain MK, Bahnson BJ. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding. Biochemistry 2001;40:609-617.
- Steiner RA, Rozeboom HJ, de Yries A, Kalk KH, Murshudov GN, Wilson KS, Dijkstra BW. X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at atomic resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2001;57:516-526.
- Brunie S, Bolin J, Gewirth D, Sigler PB. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A2 at 2.5 Å. Acess to a shielded catalytic center. J Biol Chem 1985;25(0:9742-9749.
- Tang L, Zhou YC, Lin ZJ. Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1999;55:1986-1996.

- 60. Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Magro AJ, Oliveira CZ, Soares AM, Fontes MR. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phopholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from Crotalus durissus terrificus venom. Proteins 2008;72:883-891.
- 61. Murakami MT, Gabdoulkhakov A, Genov N, Cintra AC, Betzel C, Arni RK. Insights into metal ion binding in phospholipases A2: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A2 in the Ca2+ free and bound states. Biochimie 2006;88:543-549.
- 62. Hansford KA, Reid RC, Clark CI, Tyndall JD, Whitehouse MW, Guthrie T, McGeary RP, Schafer K, Martin JL, Fairlie DP. D-Tyrosine as a chiral precusor to potent inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (IIa) with antiinflammatory activity. Chembiochem 2003;4:181-185.
- 63. Corrêa LC, Marchi-Salvador DP, Cintra AC, Sampaio SV, Soares AM, Fontes MR. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca2++independent catalytic mechanism. Biochim Biophys Acta 2008;1784:591-599.
- 64. Fernandes CAH, Marchi-Salvador DP, Silva MCO, Amui SF, Soares AM, Fontes MRM. Structure of bothropstoxin-I chemically modified by p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. To be published.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr Protoc Bioinforma 2002;2:2.3.
- Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A2-a structural review. Toxicon 1996;34:827-841.
- Lok SM, Gao R, Rouault M, Lambeau G, Gopalakrishnakone P, Swaminathan K. Structure and function comparison of *Micropechis ikaheka* snake venom phospholipase A2 isoenzymes. FEBS J 2005;272:1211-1220.
- 68. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. J Biol Chem 1994;269:29867-29873.
- 69. Krizaj I, Turk D, Ritonja A, Gubensek F. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. Biochim Biophys Acta 1989;999:198-202.
- Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta 2000;1488:1-19.
- Speedy RJ, Mezei M. Pentagon-pentagon correlations in water. J Phys Chem 1985;89:171-175.
- 72. Carrasco J, Michaelides A, Forster M, Haq S, Raval R, Hodgson A. A one-dimensional ice structure built from pentagons. Nat Mater 2009;8:427-431.

17

explore their evolution in homologous families. J Mol Biol 2005;347:565-581.

- Shimohigashi Y, Tani A, Matsumoto H, Nakashima K, Yamaguchi Y. Lysine-49-phospholipases A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. J Biochem 1995;118:1037-1044.
- Yamaguchi Y, Shimohigashi Y, Chiwata T, Tani A, Chijiwa T, Lomonte B, Ohno M. Lys-49-phospholipases A2 as active enzyme for beta-arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. Biochem Mol Biol Int 1997;43:19-26.
- de Azevedo WF Jr, Ward RJ, Canduri F, Soares A, Giglio JR, Arni RK. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A2-homologue from *Bothrops pirajai* venom. Toxicon 1998;36:1395-1406.
- Ward RJ, Chioato L, de Oliveira AH, Ruller R, Sá JM. Activesite mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. Biochem J 2002;362:89-96.
- Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. Chem Rev 2001;101:2613-2654.
- Schneider R, Sander C. The HSSP database of protein structuresequence alignments. Nucleic Acids Res 1996;24:201-205.
- Radzicka A, Wolfenden R. Comparing the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. Biochemistry 1988;27:1664-1670.
- 93. Liu X, Zhu H, Huang B, Rogers J, Yu BZ, Kumar A, Jain MK, Sundaralingam M, Tsai MD. Phospholipase A2 engineering. Probing the structural and functional roles of N-terminal residues with sitedirected mutagenesis, X-ray, and NMR. Biochemistry 1995;34:7322-7334.

- 73. Teeter MM. Water structure of a hydrophobic protein at atomic resolution: Pentagon rings of water molecules in crystals of crambin. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:6014-6018.
- 4. Higuchi DA, Barbosa CM, Bincoletto C, Chagas JR, Magalhães A, Richardson M, Sanchez EF, Pesquero JB, Araújo RC, Pesquero JL. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from Bothrops leucurus (white-tailed-jararaca) snake venom. Biochimie 2007;89:319-328.
- Strong PN, Goerke J, Oberg SG, Kelly RB. beta-Bungarotoxin, a pre-synaptic toxin with enzymatic activity. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:178-182.
- 76. Gopalakrishnakone P, Dempster DW, Hawgood BJ, Elder HY. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. Toxicon 1984;22:85-89.
- Lee CY, Hod CL, Eaker D. Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from Naja nigricollis venom. Toxicon 1977;15:355-356.
- Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. Toxicon 1995;33:1405-1424.
- 79. Toyama MH, Soares AM, Vieira CA, Novello JC, Oliveira B, Giglio JR, Marangoni S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. J Protein Chem 1998;17:713-718.
- Spencer PJ, Aird SD, Boni-Mitake M, Nascimento N, Rogero JR. A single-step purification of bothropstoxin-1. Braz J Med Biol Res 1998;31:1125-1127.
- Puri RN. Phospholipase A2: its role in ADP- and thrombininduced platelet activation mechanisms. Int J Biochem Cell Biol 1998;30:1107-1122.
- 82. Soares AM, Andrião-Escarso SH, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Marangoni S, Toyama MH, Arni RK, Giglio JR. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from Bothrops moojeni (Caissaca) snake venom. Arch Biochem Biophys 2000;373:7-15.
- 83. Singh N, Jabeen T, Pal A, Sharma S, Perbandt M, Betzel C, Singh TP. Crystal structures of the complexes of a group IIA phospholipase A2 with two natural anti-inflammatory agents, anisic acid, and atropine reveal a similar mode of binding. Proteins 2006;64:89-100.
- 84. Porter CT, Bartlett GJ, Thornton JM. The Catalytic Site Atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data. Nucleic Acids Res 2004/32/1D129-133.
- Torrance JW, Bartlett GJ, Porter CT, Thornton JM. Using a library of structural templates to recognise catalytic sites and

18



Figure 1. Crystal models of BjVIII obtained after structural refinement. A) ASU content of the space group *P*3;21 composed of the protein chains A and B, lysophosphatidic acid 1-monohexanoyl-2hydroxy-*sr*-glycero-3-phosphate (HHG[°] and HHG[°]), and two sulfate ions (SO⁴). B) ASU content of the space group *P*2;2;2; composed of the protein chains A and B, IHHG[°] and HHG[°], sporpy lacohol (IPA⁴ and IPA⁴), citrate ion (FLC⁶ and FLC⁹), and one ethylene glycol molecule (EDO⁰). All abbreviations used correspond to the ligand PDB three letter code with respective chains superscript. Figures were prepared with PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA) using the secondary structure color scheme: -a-helix in red, *P*-strand in yellow and loops in green.



Figure 2. Structural superposition evaluation of BjVIII crystallographic models. A) Superposition of each one of the four BjVIII chains and lysophospholipid molecules bound in the hydrophobic channel. Other structural motifs common to PLA2s are also presented: β -wing and Ca2+ loop. Structural regions that display RMSD value \geq 1.0 are highlighted in gray with the corresponding residue numbers. Figure was prepared with PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA) using the secondary structure color scheme: --helix in red, B-strand in yellow and loops in green. B) Root mean square deviation per residue number calculated by the SuperPose web server for the four BjVIII chains.



Figure 3. Crystallographic packing of BjVIII in the space group P3;21 showing one symmetry mate molecule (in gray) that stabilizes an alternative conformation of the C-terminal of chain B mainly through hydrophobic interactions between His111 and Leu112 and the hydrophobic channel residues of the crystal mate molecule. Figure was prepared with PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA) using the secondary structure color scheme for the P3;21 ASU BjVIII chains: chelix in red, B-strand in yellow and loops in green. This BjVIII ASU content is the same as presented in figure 1A), but in an appropriate orientation in order to emphasize the interface with the symmetry mate molecule.



22





Figure 4. Stereo diagram of the water molecules pentagonally arranged outside the BjVIII hydrophobic channel. Molecules corresponding to the BjVIII chain B neighborhood in the space group $P_{2,1,2,1}$. Diagram was prepared with PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA). Distances shown are in angstroms.

Figure 5. Stereo drawing of the $2F_{o}-F_{c}$ electron density map (1.0 sigma level, in blue) and $F_{o}-F_{c}$ electron density map (3.0 sigma level, in red) encompassing the lysophosphatidic acid modeled (HHG⁶) and amino acid residues (3.0 Å around to the ligand) corresponding to the chain B of BjVIII in the space group *F*3,21. Water molecules were omitted for clarity. Drawing was prepared with PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

Table I. Crystallographic statistics. Values in parenthesis are for the highest resolution shell.



Figure 6. Schematic diagram of the active site of BjVIII displaying the hydrogen bond interactions that stabilize the lysophospholipid molecule in the hydrophobic channel of chain A (A) and chain B (B) in the space group *P*3,21. Diagrammatic representation was prepared with the program ChemDraw (CambridgeSoft Desktop Sofware) and based on the interactions identified by the PISA web server.

25

Table II. Interfaces and quaternary structural analysis of BjVIII crystallographic models.

P212121	<i>P</i> 3₁21
A / B(x-y,y+1,-z+2/3) ^b	A / B(x-1/2,-y+1/2,-z) ^b
21 / 20	16 / 15
805.4	555.3
801.9(6838.3) ^c / 809.0(6878.4) ^c	550.7(6787.9)° / 560.0(7012.4)°
AB[HHG]2[IPA]2[FLC]2[EDO]	AB[HHG]2[SO4]2
11727.3	12166.3
3297.8	3792.3
6.4	2.7
	P2;2;21 A / B(x-y,y+1,-z+2/3) ^b 21 / 20 805.4 801.9(6838.3) ^c / 809.0(6878.4) ^c AB[HHG] ₂ [IPA] ₂ [FLC] ₂ [EDO] 11727.3 3297.8 6.4

^aInterfaces between protein chains with the highest PISA Complexation Significance Score (CSS).
^bSymmetry operation applied to 2nd interfacing structure in order to obtain the respective interface.
^cTotal solvent-accessible area for the corresponding chain. ^dThe most probable quaternary structure in solution according PISA stability criteria.

Data set	Form A	Form B
Data collection		
Space group	P212121	<i>P</i> 3 ₁ 21
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	48.4, 65.3, 84.3	55.7, 55.7, 127.9
Redundancy	7.2 (6.5)	5.0 (4.6)
Completeness (%)	96.5 (78.6)	97.2 (81.8)
^a R _{sym}	7.9 (35.4)	4.9 (17.7)
l/σ(l)	20.0 (4.6)	22.5 (6.4)
Refinement		
Resolution (Å)	38.91-1.98 (2.10-1.98)	45.16-1.83 (2.00-1.83)
N° of used reflections	18090	19790
^b R _{work} / ^c R _{free} (%)	17.3 / 23.8	19.7 / 26.5
N° of atoms ^d		
Protein	1953	1949
Ligands	89	44
Water	276	317
R.m.s. deviations		
Bonds (Å)	0.022	0.023
Angles (°)	2.278	2.208
Average B-factor		
Protein	20.6	22.4
Ligands	35.1	36.2
Water	30.3	30.6
Ramachandran plot statistics ^e		
Most favored (%)	92.2	89.3
Additionally allowed (%)	6.3	10.2
Generously allowed (%)	1.5	0.5
Disallowed (%)	0.0	0.0
PDB code	xxxx	xxxx

 $\label{eq:argum} {}^{a} \mathcal{R}_{aym} = \sum_{M \geq 2} |J_{ML} - d_{Md} \rangle |\sum_{M \geq 2} |\mathcal{M}_{ML} - \theta_{Reck} = \sum_{M \mid ||F_{0}|} - ||F_{-}|| / ||\sum_{M \mid} ||F_{0}| - \mathcal{R}_{reck} \mbox{ was calculated as } \mathcal{R}_{reck} \mbox{ using 5% of reflections which were selected randomly and omitted from refinement. } ^{4} \mbox{Number of atoms including alternative conformations. } ^{6} \mbox{Ramachandran statistics obtained from PROCHECK program.}$

26

Table III. List of parameters and their numerical values/ranges used to filter out all amino acids from different PLA2 PDB files except for those (His48 and Asp99) that are involved in the enzymatic mechanism.

^J PD parameters	Descriptor type	Determined value / Parameter range
Conservation Sh ₂ QS ^a	Relative entropy	≤ 11 (1 – 100)
Hydrophobicity	Constant	< -4 (-8.72 – 4.92)
Cross presence order	LHA ^b	≥ 2 (≥ 0)
Distance	Center of mass	≤ 8 (≥ 0 Å)

 aSh_2QS is an algorithm developed by the STING group in order to evaluate the amino acid sequence conservation and reliability, as an option to the HSSP algorithm⁹¹. bLHA corresponds to the Least Heavy Atom of the amino acid residue evaluated.

Abstract.

The action of the hydrophobic flavonoid naringin on the Crotalus durissus cascavella sPLA2 structure and biochemical activities are characterized in this work. A discrete reduction of the UV scanning signal and significant modification of the circular dichroism (CD) spectra of sPLA2 were observed after naringin treatment. This flavonoid irreversible abolishes the enzymatic activity at similar mode as p-bromophenacyl bromide (p-BPB). The treatment of sPLA2 with naringin (sPLA2-Nar) moderately decreased the myonecrosis as well as the platelet aggregation and neurotoxic effect whereas p-BPB virtually annulled both effects. Although in the initial assays naringin did not abolish the hind paw edema formation, when such flavonoid was inject previously in the rat we observed similar effects induced in citossolic PLA2 (cPLA2) by typical antiinflammatory drugs as dexamethasone. In addition, small angle X-ray scattering (SAXS) data were collected for native sPLA2 and after flavonoid treatment. Structural investigations showed that sPLA2 is an elongated dimer in solution and that naringin induced a conformational change in the dimeric configuration that has been correlated with the lost of enzymatic activity and alterations in other biological and pharmacological properties.

*Corresponding author.

1. Introduction.

Polyphenolic compounds, such as flavonoids and coumarins, are widely distributed in the plant kingdom. Some of these compounds have interesting medicinal properties, exerting antilipoperoxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral, antibacterial and anticancer effects (**Di Carlo et al.**, **1999**). Recent studies have shown that flavonoids from various plants induce a dose-dependent inhibition in vitro of phospholipid hydrolysis in both secretory and cytosolic phospholipases A2 (SPLA2 and cPLA2, respectively) (Fawzy *et al.*, 1988; Vishwanath *et al.*, 1988). Flavonoids assayed in vivo also show a significant anti-inflammatory effect against acute edema induced by carrageenan (Guardia *et al.*, 2001).

Effects of naringin on the structure and activities of the C. d. cascavella secretory phospholipase A2 (sPLA2).

Santos, M.L.¹; Toyama, D.O.²; Oliveira, S.C.B.^{3,4}; Fagundes, F.H.R.^{3,4}; Diz-Filho, E.B.^{3,4}; Iglesias, C.V.^{3,4}; Aparicio, R.¹ and Toyama, M.H.⁴*

¹Laboratory of Structural Biology and Crystallography, Institute of Chemistry, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; ²Presbiterian University Mackenzie, Sao Paulo, Brazil; ³Biochemistry Department, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; ⁴Laboratory of Macromolecules Chemistry, UNESP/CLP, Sao Vicente, Sao Paulo, Brazil.

also snow a significant anti-inflammatory effect against acute edema induced by carrageenan (Guardia et al., 2001). It has been shown that flavonoids exhibit different inhibitory levels in group I sPLA2s from porcine pancreas and Naja naja, and in group II sPLA2s from Vipera russelii and Crotalus atrox. The most important regions involved in the inhibition of sPLA2 were reported to be hydroxyl groups in 30- and 40-positions (Lindahl and Tagesson, 1997; Rotelli et al., 2003). In addition, Iglesias et al. (2005) showed that flavonoids, such as morin, can modify the secondary structure of snake venom sPLA2 similarly to that observed for the previous incubation of sPLA2 from the snake venom with 7-hidroxy coumarin (Oliveira et al., 2009). Group II sPLA2 enzymes have been found in inflammatory sites of animal models, as well as in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and various human inflammatory diseases, in which a correlation between serum sPLA2 levels and disease activity is observed (Cirino, 1998; Fuentes et al., 2002). Moreover, exogenous administration of secretory PLA2, such as snake venom sPLA2, can induce or exacerbate inflammatory response in animals (Gil et al., 1997; Câmara et al., 2003). Structural analyses revealed that snake venom sPLA2s have a similar molecular profile to those of human secretory PLA2s as well as a conserved catalytic site (Wen-Hwa et al., 1999). Naringin, hesperidin and neohesperidin have been described as

Conserved catalytic site (Wen-Hwa et al., 1999). Naringin, hesperidin and neohesperidin have been described as some of the most abundant flavanones found in Citrus genus, which are responsible for many of the pharmacological properties of Citrus flavanoids. These flavanones are particularly interesting by their antitumoral and anti-inflammatory effects that can be linked to the abilities of these compounds to inhibit enzymes involved in cell activation (Benavente-Garcia and Castillo, 2008). Since phospholipases A2 from snake venoms have been characterized as proinflammatory inducer, at first time, we investigate the effect of naringin on the edematogenic activity of sPLA2 from the Crotalus durissus cascavella venom as well as the evaluation of other biological and pharmacological activities induced by this protein. In addition, we have also investigated the structural modification induced by this polyphenolic compound on the structure of sPLA2 he other flavonoids. Daringin displays a combination of

In addition, we have also investigated the structural modification induced by this polyphenolic compound on the structure of sPLA2. As other flavonoids, naringin displays a combination of multiple hydroxyl groups substituting a ketone-containing flavonoid skeleton and a glycoside portion (Hodek *et al.*, 2002). Reports on flavonoid structural-functional relationships have demonstrated that antioxidant activities and enzyme-inhibition are dependent upon particular flavonoids (position, number, and nature of groups) and

Key words: naringin, SPLA2, Crotalus durissus cascavella, Circular Dichroism, SAXS, bioinformatics, enzymatic activity, antibacterial property and pharmacological effects.

- 2 -

presence of glycosylation (Benavente-García and Castillo, 2008). Phenolic compounds, particularly flavonoids, have been shown to posses an important antioxidant activity toward free radicals which are associated with the natural metabolism of aerobic cells (Benavente-García et al., 1997). In order to retrieve structural information from the native phospholipase A2 (SPLA2) and after naringin treatment (SPLA2-Nar) a variety of solution based techniques have been used in the present work As small angle X-ray scattering (GAXS) is a sensitive

In order to retrieve structural information from the native phospholipase A2 (sPLA2) and after naringin treatment (sPLA2-Nar) a variety of solution based techniques have been used in the present work. As small angle X-ray scattering (SAXS) is a sensitive technique for analyzing global shape and dimensions of macromolecules in solution (Svergun and Koch, 2002), we have mainly employed such methodology together with molecular modeling, circular dichroism and bioinformatic analysis to provide the required information.

Several sPLA2 crystallographic studies have been reported in the literature describing the main structural features of this class of protein (Arni and Ward, 1996) and its correlations with the biochemical properties (Burke and Dennis, 2009). However, there are just a few reports regarding SAXS analysis of phospholipases A2 (Arni et al., 1999; Murakami et al., 2007). In these studies two different oligomeric states were observed for sPLA2s in solution, monomeric and dimeric, for those purified from Cerrophidion godmani (Arni et al., 1999) and Bothrops jararacussu (Murakami et al., 2007) venoms, respectively.

(Aring et al., 1999) and Bolinops Jalacossa (Murakami et al., 2007) wenoms, respectively. Additionally, electrophoretic and spectroscopic studies have suggested that the dimer-like structure in solution is common for other sPLA2 from snake venoms (Arni et al., 1995; dos Santos et al., 2008). Two main different conformations are reported by crystallographic models for these dimers, an extended conformation maintained by polar interactions formed between the N-terminal helix regions and β -wing residues of each monomer, and a compact dimeric organization of the molecules in which the hydrophobic channels are buried (Ward et al., 1998; Giotto et al., 1998) although, in solution, only the compact conformation has been observed previously (Murakami et al., 2007). In this paper, we present a new extended dimer configuration for phospholipases A2 in solution. The low resolution model obtained for sPLA2-Nar presents an interesting bending in comparison with the envelopes for the native sPLA2 that seems to be correlated with the enzymatic and pharmacological alterations observed in our studies.

2. Materials and Methods.

2.1. Venoms and reagents.

Venom from Crotalus durissus cascavella was kindly donated by the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil). Naringin was obtained from Sigma Co., Ltd. (USA). Solvents, chemicals and reagents used in protein purification and characterization were those of HPLC grade or higher acquired from Sigma-Aldrich chemicals (USA), Merk (USA) and Bio-Rad (USA). Male and Female Wistar rats (120-150 g) and Swiss mice (18-20 g) used in the pharmacological assays were obtained from the University's Central Animal House. All animal experiments were approved by the State University of Campinas (UNICAMP) Ethics Committee (São Paulo, Brazil).

2.2. Purification of sPLA2 from the Crotalus durissus cascavella

Whole venom was first fractioned as previously described by de Oliveira et al. (2003). A brief description of the procedure follows. Dried venom (45 mg) was dissolved in ammonium bicarbonate buffer (0.2 M, pH 8.0) and clarified by centrifugation (4500g, buffer (0.2 M, pH 8.0) and clarified by centrifugation (4500*g*, 1 min). The obtained supernatant was injected onto a molecular exclusion HPLC column (Superdex 75, 1 × 60 cm, Pharmacia) and chromatographic run was developed with flow rate for fraction elution of 0.2 mL/min and monitoring absorbance at 280 nm. The separated crotoxin-like fraction was simmediately lyophilized. After this first step, the crotoxin-like fraction was subjected to reverse phase chromatography using a µ-Bondapack C18 column (0.39 × 30 cm) with flow rate for fraction elution of 1 mL/min and the chromatography was monitored at 280 nm. The sPLA2 from C. durissus cascavella was eluted using a non-linear gradient of acetonitrile (66% in 0.1% of TFA). The resulting phospholipase A2 was termed sPLA2, its purity degree was evaluated by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry on a MALDI-TOF mass spectrometer, as previously a MALDI-TOF mass spectrometer, as previously spectrometry on described Toyama et al. (2003) and Toyama et al. (2005).

2.3. Incubation of sPLA2 with naringin and purification of modified sPLA2 (sPLA2-Nar).

The incubation of sPLA2 with naringin (Nar) (mol:mol), followed procedures described by Iglesias et al. (2005). Naringin was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO). Solvent concentration during incubation with sPLA2 solution never exceeded 1%. The purified sPLA2 (1.5 mg, 100 nmol/nL) was dissolved in 1000 µl of water and after complete homogenization, 10 µl of naringin solution (100 nmol) was added for 60 minutes in a water bath at 37 °C. Samples of 200 μ l of this mixture were loaded onto a preparative reverse phase HPLC column to separate the modified sPLA2 (sPLA2-Nar) from naringin. Samples were eluted using a discontinuous gradient of buffer (66.6% of acetonitrile in TFA 0.1%) at a constant flow rate of 2.0 mL/min. The chromatographic run was monitored at A280 nm.

2.4. Measurement of sPLA2 oxidation.

Oxidation of sPLA2 after incubation with naringin was determined by measuring the absorption spectra of sPLA2 and sPLA2-Nar using wavelengths ranging from 200 to 300 nm. The chromatographic run was performed utilizing a Waters HPLC, with a 991 photo diode detector (PDA 991, Waters) to record the absorption spectra of the samples. Detection was carried out at A214 nm, with peak scanning between 190 and 310 nm (3 nm step). In addition, the chemical modification of the amino acid residues of sPLA2 in presence of naringin was evaluated by amino acid analysis. In this protocols, approximately 1 nmol of purified protein (sPLA2 or sPLA2 Nar) was hydrolyzed with 6 N HCl (200 µl) in the presence of 10 µl

- 5 -

volume of 3.8% trisodium citrate. After removing the platelet-rich plasma (PRP), the remaining blood was prepared by centrifugation of citrated blood at 200g for 10 min and washed platelets (WP) were obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1500g for 20 min. Platelets were left for 1 h at room temperature to recover their sensitivity to aggregating agents. Platelet counts were performed on a Coulter S Plus (Coulter Electronics, Hialeah, FL) or by phase-contrast microscopy. Platelet aggregation was carried out using 400 μ L of the washed platelets solution in a cuvette and kept at 37 °C with constant stirring.

The desired concentration of protein was added 3 minutes prior to the addition of platelet aggregation inducers (thrombin for washed platelets). Subsequently, the aggregation was recorded for 5-10 min by using an aggregometer (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). Aggregation experiments were performed with sPLA2 or sPLA2-Nar in concentrations of 10 µg in a final volume of 20 µL.

2.6.3. Neurotoxic effect assav.

Male chicks (4-8 days old) were killed with ether and Male chicks (4-8 days old) were killed with ether and the biventer cervicis muscle was removed (Ginsborg and Warriner, 1960; Dal Belo et al., 2005) and mounted under a resting tension of 1 g in a 4 mL organ bath containing aerated (95% 02 + 5% CO2) Krebs solution (pH 7.5, 37 °C) of the following composition (mM): 118.7 NaCl, 4.7 KCl, 1.88 CaCl2, 1.17 KH2PO4, 1.17 MgSO4, 25.0 NaHCO3 and 11.65 glucose. A bipolar platinum ring electrode was placed around the tendon, which ran the nerve trunk supplying the muscle. Indirect stimulation was applied with a Grass S4 stimulator (0.1 Hz, 0.2 msec, 3-4 mV). Muscle contractions and contractures were recorded by connecting the preparation to a force displacement transducer (Narco connecting the preparation to a force displacement transducer (Narco Biosystems Inc) coupled to a Gould RS 3400 recorder. Contractures to exogenously applied acetylcholine (ACh, 55 or 110 µM for 60 s) and KCl (5 mM for 120-130 s) were obtained in the absence of nerve stimulation prior to the addition of modified and non-modified sPLA2 (10 $\mu g/ml)$ and at the end of the experiment. The preparations were allowed to stabilize for at least 20 min before the addition of ACh or KCl and a single concentration (10 $\mu g/ml$) of the compounds.

2.7. Paw edema assay.

Male Wistar rats (120-150 g) were anaesthetized with halothane (inhaled). Hind paw edema was induced by a single subplantar injection of Nar-treated or non-treated sPLA2 (10 μg per paw). Paw volume was measured immediately before the injection of the drugs and at selected time intervals thereafter (30, 60, 90, 120, 180 and 240 min) using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, 240 min) using a hydroplethysmometer (model 7150, Ugo Basile, Italy). All drugs were dissolved in sterile saline solution (0,98). Results were expressed as the increasing in paw volume (mL) calculated by subtracting the basal volume. When desired, the area under the time-course curve (AUC) was also calculated (trapezoidal rule) and the results expressed as total edema volume (mL per paw). In addition, three groups of rats (n=4) were injected (i.p.) with dexamethasone or Naringin (3.0 mg/kg) 30 min before the injection of native sPLA2 (10 µg per paw). Each of these groups

of phenol. Amino acid hydrolysis was performed at 106 °C for 24 h. After this time, the excess of HCL was removed and the hydrolyzed amino acids were redried with an aqueous solution of ethanol:water:triethylamine 2:2:1 by volume. Post-column derivatization was performed with an aqueous solution of phenylisothiocyanate

(ethanol:water:triethvlamine:phenvlisothiocvanate 7 • 1 • 1 • 1 (ethanoliwateritriethylamineiphenylisotniocyanate //iiii by volume). Both samples and amino acid standards were derivatized using a PICO-TAG amino acid analyzer system. The analysis of the PTH-amino acid was also carried out using a PICO-TAG amino acid analyzer (Waters).

2.5. Measurement of sPLA2 activity.

The sPLA2 activity was measured following protocols described by Rigden et al. (2003) and modified by Toyama et al. (2003) for 96-well plate, using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (4N30BA, BIOMOL, USA) as substrate. Enzyme activity, expressed as the initial BIOWOL, USA) as substrate. Enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction (Vo), was calculated based on the increasing in absorbance after 20 min. All assays were performed using n=12 and absorbance at 425 nm was measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). After addition of native or naringin treated sPLA2 (20 µg), the reaction mixture was incubated for up to 40 min at 37 °C and absorbance read in 10 min interval. in 10 min intervals.

2.6. Biological and pharmacological activities.

2.6.1. Myotoxic activity

Creatine kinase (CK) was assayed using the CK-UV kinetic kit from Sigma following the protocol described by Diz Filho et al. (2009). Native sPLA2, chemically treated with naringin (sPLA2-Nar) or treated with p-BPB (sPLA2-pBPB) (1 μ g/µL) were injected i.m. (50 $\mu L)$ into the left gastrocnemius muscle of male Wistar rats (90-110 g; n=6). Control rats received an equal volume of 0.15 M NaCl. After 3 h, the rats were anesthetized and blood was collected from the abdominal *vena cava* into tubes containing heparin as anticoagulant. The plasma was stored at 4 °C for a maximum of 12 h before assaying. The amount of CK was then determined using 4 µL plasma, which was incubated for 3 min at 37 °C with 1.0 mL of the reagent according to the Sigma kinetic CK-UV protocol. Activity was expressed in U/L, one unit resulting from the phosphorylation of 1 µmol of creatine/min at 25 °C.

2.6.2. Platelet aggregation studies.

The platelet aggregation activity was measured following methods described by Fonseca *et al.* (2006) and Oliveira *et al.* (2008). Venous blood was collected with informed consent from healthy volunteers who denied taking any medication in the previous 14 days. Blood was collected by a two-syringe technique using polypropylene syringes and 19-gauge needles, and immediately transferred into polypropylene tubes containing 1/10th of final

- 6 -

received 0.1 mL of drug. Dexamethasone and PBS were used as control to evaluate the anti-inflammatory effect of Naringin. The chemical modification of sPLA2 with p-BPB was carried out according to the protocol described by Landucci et al. (2000) and Hernandez-Oliveira et al. (2005)

2.8. Antibacterial activity.

The antibacterial activity was performed as described by Santi-Gadelha et al. (2008) and the structural modification was done according Toyama et al. (2006) protocols. The Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae (G-) and Staphylococcus mutans (G+) cells were harvested from fresh agar plates and suspended in sterile distilled water (A600nm = 3×10^8 CFU/mL). Aliquots of bacterial suspension were diluted to 10^3 colony-forming units/mL (CFU/mL) and incubated with sPLA2 or sPLA2-Nar samples (75 µg/mL) for 60 min at 28 °C, after which survival was assayed on nutrient agar (Difco) plates of morphologic alterations were performed in absence (control), presence of sPLA2 from the Crotalus durissus cascavella venom or sPLA2-Nar. sPLA2-Nar.

Assessments of the morphological modifications induced by the Assessments of the morphological modifications induced by the native sPLA2 or sPLA2-Nar obtained using the purification protocols were conducted with a transmission electron microscope. Bacterial samples were centrifuged, recovered and immersed in fixative solution (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, containing 2.5% (v/v)) for 12 h at 4 °C. Samples were then fixed with 1% osmium tetraoxide for 2 h at 4 °C, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Epon resin. Polymerization was performed at 60 °C for 48 h and ultra-thin sections were prepared with a Sorvall MT2 ultramicrotome. Sections were placed on grids and stained with 2% uranyl acetate for 15 min, followed by 2.6% citrate lead for 15 min. Samples were observed under a LEO 906 transmission electron microscope, operating range of 40-100 kV.

2.9. Statistical analyses.

Results are reported as the means \pm SEM of n experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test when several experimental groups were compared with the control group. The confidence limit for significance was 5%.

2.10. Circular dichroism (CD) spectroscopy.

Native and modified sPLA2 with naringin were dissolved in phosphate buffer 10 mM, pH 7.4, to a final concentration of ${\sim}7~\mu M$ and ${\sim}4~\mu M$ for sPLA2 and sPLA2-Nar, respectively. Samples were Transferred to quartz curves with an optical path length of 1 mm. Circular dichroism spectra between wavelengths 185-300 nm were measured with a JASCO 710 using a bandwidth of 1 nm and a response time between 2-4 s. Scans were accumulated for each sample and all spectra were corrected by subtraction of buffer blanks. Comparison

of spectra was performed after concentration and optical path length normalization in terms of molar circular dichroism (CD)

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

SAXS measurements were carried out at the D02A-SAXS2 beamline SAXS measurements were carried out at the D02A-SAXS2 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) (Kellermann et al., 1997). Samples were kept at 4 °C in the sample cell (Cavalcanti and Torriani, 2004) and data acquisition was performed taking several 600 s frames for each sample, which allowed for the control of any possible radiation damage and improvement of the statistical errors. Data were collected at a sample-to-detector distance of 985.7 mm using a MAR CCD detector (MAR Research) with x-rays at a wavelength of 1.488 Å, to cover q values ranging from 0.013 to 0.34 Å⁻¹, where q, the moment transfer vector, is defined as q = 4 msin6/A. Different concentrations of sPLA2 were measured to assess A , where c, the moment transfer vector, is defined as q = wishin/A. Different concentrations of sPLA2 were measured to assess aggregation (Svergun and Koch, 2003; Tsutakawa et al., 2007) and interparticle interference effects (Tsuruta and Johnson, 2001; Panda, 1970). The best data sets were collected for samples of native sPLA2 and sPLA2 treated with naringin (sPLA2-Nar) at ~4 mg/mL

native sPLA2 and sPLA2 treated with naringin (sPLA2-Nar) at ~4 mg/mL and ~7 mg/mL, respectively. Initial data treatment of the scattering intensities was performed using the Fit2D software (Hammersley *et al.*, 1996). Data were reduced to a 1D scattering profile and normalized according to intensity and sample attenuation. The net scattered X-ray intensities for the proteins were determined by subtracting a normalized buffer blank from each protein data set. Different frames for each sample were inspected and averaged using the program PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003). Distance distribution functions, p(r), and radius of gyration, Rg, were evaluated by the indirect Fourier transform method implemented in the program ROM (Svergun, 1992) transform method implemented in the program GNOM (Svergun, 1992).

transform method implemented in the program GNOM (Svergun, 1992). The Rg value was also estimated using a Guinier analysis (Guinier and Fournet, 1955) in which the ln of I(q) was plotted against q^2 to yield a straight line whose slope is proportional to Rg. Additional analysis were performed by plotting Iq^2 against q (Kratky plot) that allows the evaluation of the degree of protein globularization (Semisotnov et al., 1996). The shape of the Kratky plot is sensitive to the conformational state of the macromolecule in solution. Globular folded macromolecules have bell-shaped curves, while for completely upfolded rates a platagu or a slightly

process of the construction of the complete of the matrix of the complete of - 9 -

induced by naringin during incubation of the native protein with this flavonoid.

3.2. Enzymatic and other sPLA2 activities.

The enzymatic activity of native sPLA2 was virtually abolished by previous treatment with naringin that showed similar inhibition potency as p-BPB (Figure 3a; n=12 experiments; P<0.05). Native sPLA2 potency as p-BPB (Figure 3a; n=12 experiments; F<0.05). Native sPLA2 induced a moderate myotoxic effect as shown in the Figure 3b. Previous treatment of sPLA2 with naringin reduced the myotoxic effect induced by sPLA2 two fold whereas p-BPB abolished this effect (Figure 3b; n=6 experiments; F<0.05). Native sPLA2 induced an irreversible neuromuscular blockage at 70 minutes after injection of toxin (Figure 3c), while sPLA2 treated with naringin induced moderate blockage if compared to native sPLA2. Despite that both compounds naringin and p-BPB virtually abolish the enzymatic power of sPLA2, only p-BPB treatment irreversibly abolished the neurotoxic effect induced by sPLA2 (Figure 3c; n=6 experiments). The platelet aggregation induced by native sPLA2 was strongly reduced by chemical treatment with naringin and abolished by chemical treatment with p-BPB (Figure 3d, n=4 experiments for each drug).

treatment with naringin and abolished by chemical treatment with p-BPB (Figure 3d, n=4 experiments for each drug). Subplantar injections of treated and non-treated sPLA2 (5 µg/paw; n=5) evoked a significant acute edema (P<0.05) when compared to the control (PBS) (Figure 4a). Naringin treatment induced a slight decreasing in edema volume in comparison to native sPLA2, whereas p-BPB strongly reduced this effect. By other side, the previous injection of naringin in the paw affected the edema formation. In this new assu, sPLA2-Nar prevented the edema induced formation. In this new assay, sPLA2-Nar prevented the edema induced by native sPLA2 whereas dexamethasone (Dexa), a potent synthetic anti-inflammatory, reduced significantly this pharmacological effect (Figure 4b).

sPLA2 showed an antibacterial activity Native against Xanthomonas axonopodis pv passiflorae and Streptococcus mutans. In both cases, we observed that sPLA2 induced a strong modification of both cases, we observed that stars infigures 5 and 5b. These results suggest that enzymatic power of sPLA2 is important for antibacterial activity, and that the inhibition of the sPLA2 enzymatic activity by naringin, virtually abolish its antibacterial activity (Figures 5a and 5b).

3.3. SAXS and bioinformatic analysis.

The effect of naringin treatment on the *C. d. cascavella* sPLA2 macromolecule organization was evaluated through a systematic structural study. Despite several attempts to crystallize this protein, it was not find any positive crystal hit what made impossible obtaining a high resolution model through X-ray crystallography. Thereby, an alternative strategy to acquire useful structural information to interpret biochemical and pharmacological results obtained in this work was launch. Initially, a homology modeling calculation and secondary

Initially, a homology modeling calculation and secondary structure analysis using SWISS-MODEL and PSIPRED web servers, respectively, was performed. *C. d. cascavella* sPLA2 homology model was built based on the template structure of the crotoxin B from

independent models. To clarify the visualization, the average model Independent models. To clarify the Visualization, the average model was represented by a surface calculated using the program NCSMASK (CCP4, 2002). Superpositions of crystallographic structures of several phospholipases A2 found in the Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org) and the most probable SAXS models derived from DAMAVAVER were done using the program SUPCOMB (Kozin and Svergun, DAMAVAVER were done using the program SUPCOMB (Kozin and Svergun, 2001). Crystallographic sPLA2 models used in the interpretation of the low resolution models were chosen based on the smallest discrepancy (Chi) between the experimental scattering data and the scattering intensities computed for these models using the program CRYSOL (Svergun et al., 1995). Additionally, rigid body modeling with the program SASREF (Petoukhov and Svergun, 2005) and flexible docking with the program package SITUS (Wriggers et al., 1999) were performed aiming the best interpretation of the SAXS envelopes.

2.12. Additional computational analysis.

An automated comparative homology modeling using the SWISS-MODEL web server (Schwede et al., 2 http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html) was employed 2003; to mtcp.//swissmodel.expasy.org//swiss-muDEL.ntml) was employed to generate an atomic coordinate model for C. d. cascavella sPLA2. PSIPRED (Jones, 1999; McGuffin et al., 2000) was used for secondary structure prediction (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/). Protein assemblies and interfaces analyses were performed with the PISA web server (Krissinel et al., 2007; http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html).

3. Results

3.1. Chemical and secondary structure modifications.

Chemical treatment of purified sPLA2 with naringin was conducted according the protocols established by Iglesias et al. (2005). In these conditions it was observed a discrete decreasing of the absorbance of sPLA2 previously treated with maringin (sPLA2-Nar) in the wavelength region between 270-285 nm (Figure 1a) which can be attributed to the spectroscopic absorption of the aromatic amino actiriouted to the spectroscopic absorption or the aromatic amino acid residues. Amino acid analysis indicated that naringin mainly induced modification of the aromatic amino acid residues and histidines, similar to found in a previous work for morin (Iglesias et al., 2005), but it was also verified slight changes in serie composition (Figure 1b).

composition (Figure 1b). In addition to the chemical modification, circular dichroism measurements of sPLA2 native and sPLA2-Nar presented a significant decreasing of the CD signal due to the flavonoid treatment (Figure 2a). This spectroscopic alteration suggests that the residues modified by the action of naringin are important constituents of

modified by the action of naringin are important constituents of secondary structure elements. Mass spectrometry results showed that sPLA2 presents an increasing of its mass-to-charge ratio after naringin treatment in comparison with the sPLA2 native (Figure 2b). In the same way as the alterations observed in the CD spectra, the increasing of the molecular mass for sPLA2 is consequence of the chemical modification

- 10 -

Crotalus durissus terrificus snake venom (PDB ID: 2QOG, chain C, Marchi-Salvador et al., 2008) that presents 90% of sequence identity. According secondary structure prediction, C. d. cascavella sPLA2 model shows the same structural motifs of phospholipases A2: $\beta\text{-wing},$ hydrophobic channel, calcium binding loop and C-terminal regions.

Structural information was also obtained through the structural information was also obtained through the experimental methodology of SAXS in which tertiary and quaternary structures of native sPLA2 and sPLA2-Nar were investigated. The scattering curves for both native and treated sPLA2 with associated distance distribution functions, Guinier and Kratky plots are shown in Figure 6.

in Figure 6. The Guinier plot shown in the inset of Figure 6a exhibits a linear behavior within the interval of 0.026 Å⁻¹ < q < 0.058 Å⁻¹ for sPLA2 and of 0.026 Å⁻¹ < q < 0.056 Å⁻¹ for sPLA2. Nar, characteristic for monodisperse systems, from which radii of gyration (Rg) of 23 Å and 24 Å were derived, respectively. The p(r) functions calculated with GNOM from the scattering curves are shown in Figure 6b. In both SPLA2 and sPLA2-Nar cases the Kratky plot exhibited a characteristic maximum of correctly envelated proteins (Figure 6c).

maximum of correctly enovelated proteins (Figure 6c). Calculated radius of gyration using program CRYSOL for several SPLA2 crystallographic models with different number of molecules in the asymmetric unit (ASU) (PDB ID: 1A2A, 1BJJ, 2QOG, 1CL5, 1JIA and 2QOD) led to a regular dependency of Rg values with the number of molecules in the ASU: ~35 Å for eight, ~30 Å for six, ~25 Å for four, from 18 to 24 Å for two and from 13 to 14 Å for one molecule, suggesting that C. d. cascavella sPLA2 protein in solution, before and after treatment with naringin, is composed by two polypeptidic chains. Determination of the molecular weight with the web tool "SAXS MOW" confirmed that sPLA2 and sPLA2-Nar appear as a dimer in solution in the concentrations evaluated, with an average molecular weight of ~28 kDa while the expected molecular weight based in the amino acid sequence for sPLA2 is 28.9 kDa. Low resolution models recovered from scattering data showed an elongated shape as expected by the distance distribution functions asymmetric format (Figure by the distance distribution functions asymmetric format (Figure 6b). Additionally, envelope models of SPLA2-Nar are interestingly different from the native envelopes (Figure 7). According to our models, it seems that naringin has induced a conformational modification in the C. d. cascavella SPLA2 dimer. In order to interpret our boundary of different dimer confirmations di dimer di dimer dimer dimer dimer dimer dimer dimer dimer dime

conformational modification in the *C. d. cascavella* SPLA2 dimer. In order to interpret such envelopes, different dimer configurations of several SPLA2 crystallographic models found in PDB were superposed, including that dimers formed by symmetric mates (results not shown). Using the program CRYSOL to compare the experimental scattering data and the scattering intensities computed from these models, the lowest discrepancy was found for the dimer made of chains A and E of agkistrodotoxin from Agkistrodon halys pallas venom (PDB ID 1BJJ, Tang et al., 1999). Analysis of protein assemblies and interfaces using PISA web server suggested that chains A and E assembly of agkistrodotoxin is stable in solution showing one of the highest agkistrodotoxin is stable in solution showing one of the highest $\Delta_{\rm diss}G$ and equal to 6.7 kcal/mol.

 $A_{\rm diss}G$ and equal to 6./ kcal/mol. Finally, the C. d. cascavella SPLA2 homology model obtained using the SWISS-MODEL web server was superposed onto chain A and chain E of agkistrodotoxin dimer as an attempt to evaluate biochemical and structural SPLA2 alterations after naringin

treatment (Figure 8). This new dimeric assembly built in silico for C. d. cascavella sPLA2 was then used in the interpretation of the low resolution model bending due to the naringin treatment.

4.Discussion.

4.1. Enzymatic and antibacterial activities.

Polyphenolic compounds, similar to naringin, have been characterized as highly specific and potent inhibitors of phospholipasic A2 activity. This action of flavonoids and other polyphenolic compound are attributed to an ability to bind the polyphenoic compound are attributed to an ability to bind the hydrophobic catalytic pocket of this enzyme, such as found to morin, vitamin E and umbelliferone incubated with sPLA2 (Iglesias *et al.*, 2005; **Chandra et al.**, **2002**; **Toyama et al.**, **2009**). Additionally, it has been reported that the position of the hydroxyl groups found in the flavonoid structure, 3'- and 4'-position in the B-ring, are

the flavonoid structure, 3'- and 4'-position in the B-ring, are important for the selective inhibition of sPLA2 activity of group II, such as phospholipases A2 from *Crotalus durissus ssp* and *Bothrops sp* (Lindahl and Tagesson, 1997). According to our results, the enzymatic activity of native sPLA2 from *C. d. cascavela* was strongly reduced after the treatment with naringin, almost at the same level as verified to the potent sPLA2 enzymatic inhibitor p-bromophenacyl bromide (Figure 3a). These indigene point the paries and p-PEP is phibit the phospholipacie A2

With Maringin, annositat the personal level as verified to the potent SPLA2 enzymatic inhibitor personaphenacyl bronde (Figure 3a). These findings point that naringin and p-BPB inhibit the phospholipasic A2 activity probably in the same way, interacting with amino acid residues of *C. d. cascavella* SPLA2 located in the hydrophobic channel that comprises the catalytic triad of such enzymes, as observed in crystallographic studies for a sPLA2 from *Bothrops jararacussu* venom (Magro *et al.*, 2005). The antibacterial property induced by native sPLA2 from *C. d. cascavella* appears to be the toxin effect more closely related to the enzymatic activity, as found to other sPLA2 that employed the enzymatic catalysis for antibacterial function (Nevalainen *et al.*, 2008). While native sPLA2 shows a high phospholipasic function, bacterial cell membrane damage is significant. After naringin treatment, with the pronounced reduction of the catalytic activity, the level of lysis is also decreased (Figure 5). Thus, the abginificant lost of antibacterial activity for the sPLA2 from the *Crotalus durissus cascavella* venom. Crotalus durissus cascavella venom.

4.2. Pharmacological properties.

In addition to the accentuated decreasing of the catalytic activity, sPLA2 inhibitors are able to recognize pharmacological sites of such enzymes, consequently affecting their pharmacological sites of such enzymes, consequently affecting their pharmacological action (Boilard et al., 2006). As our studies showed, the chemical treatment of sPLA2 with naringin only reduced the pharmacological effects, among them myotoxicity (Figure 3b), neurotoxicity (Figure 3c), pro-platelet aggregation activity (Figure 3d) and edema formation (Figure 4a), induced by native sPLA2 from *C. d. cascavella* venom in comparison with the same assays performed with the inhibitor p-bromophenacyl bromide.

- 13 -

interfacial residues correspond to that ones which were affected by the action of naringin and its chemical modification must be responsible for the conformational change observed in the dimer configuration after naringin treatment.

It has been reported that the dimerization of snake venom sPLA2 is a common event that strongly increase the enzymatic power of sPLA2 in solution and determinate the allosteric behavior for phospholipases A2 from the Crotalus durissus sap and Bothrops sp (Toyama et al., 1995; Soares et al., 1995; Lee et al., 1995; Toyama et al., 2003; Diz Filho et al., 2009). Our low resolution models for sPLA2 and sPLA-Nar allow us to suggest that besides the chemical, secondary and tertiary modifications induced by naringin in the sPLA2 from *C. d. cascavella*, the dimer bending might have reduced a possible enzymatic allosteric effect presented by this protein.

4.4. Chemical and structural modifications.

The observed UV absorption modification after sPLA2 treatment

The observed UV absorption modification after sPLA2 treatment with naringin can be mainly attributed to chemical changes in the aromatic amino acid residues and histidines of this enzyme, as verified previously by Iglesias *et al.* (2005) for another flavonoid called morin. In addition, mass spectrometry analysis demonstrated that the chemical shift induced by naringin is very discrete, not indicating the attachment of naringin in the sPLA2 structure. The same behavior was found in previous studies to sPLA2 treated with umbelliferone (**Toyama et al.**, 2009). Circular dichroism spectroscopy showed that naringin treatment induced considerable alteration in the CD signal of the sPLA2 as consequence of modifications mainly of the α -helix structural elements. In case of phopholipases A2, helical structures are responsible for forming the hydrophobic channel (Arni and Ward, 1996) which is occupied by the acyl chains of the substrate when bound, positioning the cleavage centre towards the catalytic channel is filled with ordered water molecules (Soct et al., 1991). Therefore, in addition to our spectroscopic analyses, structural bear of the parting to be analyse, structural back Therefore, in addition to our spectroscopic analyses, structural characterization reports lead us to believe that naringin has predominantly acted in the hydrophobic channel of sPLA2 from C. d. cascavella.

Although side-chain orientation is still one of the main challenges in the determination of protein structures from the sequence (Al-Lazikani *et al.*, 2001), methods based on rotamer libraries (Ponder and Richards, 1987) have improved the prediction libraries (Ponder and Richards, 1987) have improved the prediction reliability in terms of side-chain torsional angles for preferred conformations (Al-Lazikani et al., 2001). However, it is known that amino acid side-chains in both crystallographic and molecular modeling models may differ from that ones in the physiological conditions (Levitt et al., 1997). At this point of view and considering the nature of the results derived from the present work, more important than address specific interactions and the most probable biologically active side-chain conformations of the important amino acids is the definition of the molecular region where naringin has acted. where naringin has acted.

One possible explanation to the not associated pharmacological One possible explanation to the not associated pharmacological and enzymatic activities is that the chemical modification of some amino acids induced by naringin, remarkably aromatic amino acids and histidines, has affected the toxin ability to interact with the pharmacological receptor, but did not lead to the abolishment of this function. Ours results and those described by Cardoso et al. (2001) demonstrate that enzymatic activity of the sPLA2 is not crucial for pharmacological activities of this sPLA2 isolated from the C d cascarella venom

(2007) Genomistrate chargeneric activity of the start is not crucial for pharmacological activities of this SPLA2 isolated from the *C. d. cascavella* venom. It is worth of note that in terms of edema formation it was initially observed that this pharmacological effect seems to not be correlated with the sPLA2 catalytic activity, and that naringin previously applied in the animals strongly inhibited the hind paw edema induced by the sPLA2-Nar (Figure 4b). Since flavonoids and other organic compounds from plants, such as flavones and alkaloids, are able to inhibit the enzymatic activity of secretory PLA2 (Fawzy et al., 1988; Vishwanath et al., 1988), as well as the catalytic capacity in vitro of cytoplasmatic PLA2 (cPLA2), Lipoxygenase/Cyclooxygenase, PLC and others related mammalian enzymes (Middleton et al., 2000), it appears that the inflammatory effect observed for sPLA2-Nar on the hind paw (Figure 4a) is, in reality, mainly caused by the action of cPLA2. Therefore, the inhibition of cPLA2 or other related enzyme from the animal, only remaining the pharmacological effect of the native sPLA2 from *C. d. cascavella* (Figure 4b).

cascavella (Figure 4b). This complementary assay This complementary assay suggests that unlike other pharmacological properties, the edema induced by sPLA2 is dependent of the membrane phospholipid hydrolysis generating pharmacologically of the membrane phospholipid hydrolysis generating pharmacologically active lipids. In the other hand, the pharmacological modes of action for myotoxicity, neurotoxicity and platelet aggregation of sPLA2 are not completely related with the enzymatic activity but, in turn, might involve the ability of specific sPLA2 molecular regions to recognize pharmacological sites on the cells as proposed by Cardoso *et al.* (2001) for crotoxin, one phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* venom.

4.3. sPLA2 C. d. cascavella dimer models in solution

Structural analyses of native sPLA2 and sPLA2-Nar performed by SAXS indicated that both samples behave as dimers in solution. Using high sequence identity snake venom sPLA2 crystallographic models in order to interpret our low resolution models, it was observed that *C. d. cascavella* dimers present a new extended configuration never seen before for phospholipases A2 in solution. It was also verified that naringin treatment has induced conformational changes in sPLA2 with a clear bending of the dimer. Although unsuccessful, several attempts to model this bended dimer were done employing rigid body modeling and flexible docking.

Were done employing rigid body modeling and flexible docking. However, the interpretation of the SAXS model based on *C. d. cascavella* homology model superposed on the agkistrodotoxin crystallographic "dimer" (PDBID: IBJJ, chains A and E) enabled identify that some aromatic amino acids, histidine and serine of *C. d. cascavella* are present in the dimer interface (Figure 8). These

- 14 -

Based on the chemical modification and circular dichroism experiments, naringin has interacted predominantly in the ${\tt SPLA2}$ molecular region with the highest concentration of aromatic amino molecular region with the might constitution of a constitution and acid residues, histidines and series (shown in yellow in Figure 8) that is composed by the bottom of the hydrophobic channel (between N-terminal, α_2 - and α_3 -helix) and the β -wing motif. Apart from containing the majority of the modified amino acids residues, the hydrophobic channel is also the SPLA2 structural domain responsible for the catalysis, comprising the catalytic triad: Gly31, His47 and Asp89 according sPLA2 amino acid sequence (shown in red in Figure 8). So, chemical and structural modifications in this enzymatic or so, chemical and scructural modifications in this enymatic region by the action of naringin is suggested to be the main reason for the inhibition of enzymatic power, correlated edema formation and antibacterial functions of sPLA2 from *C. d. cascavella*.

5. Conclusions.

Structural studies performed in this work permitted identify the probable region of the *C. d. cascavella* sPLA2 that might have been affected by the naringin action. This region seems to be responsible for some of the pharmacological and biological properties of this enzyme. Chemical and structural modifications also have interfered in the active site of sPLA2 and in its possible enzymatic allosteric behavior.

Acknowledgements.

We gratefully acknowledge the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS) for the use of the Small Angle X-ray Scattering beamlines under proposal D11A-SAXS1-5366. We are also grateful to Daniel Razzo for helping with CD data collection. This work was supported by CNPq, FAPESP and FAEPEX/PRP/UNICAMP.

References

- Al-Lazikani, B., Jung, J., Xiang, Z. & Honig, B. (2001). Protein structure prediction. Current Opinion in Chemical Biology, 5, 51-56.
- Arni, R.K. & Ward, R.J. (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. & Ward, R.J. (1996). Phospholipase A2 A Structural Review. Toxicon, 34, 827-841.
- 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-phopholipase A2 homologue isolated from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani. Archives of Biochemistry and Biophysics, 366, 177-182.
- alo, C.A., Leite, G.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Corrado, A.P., Fontana, M.D., Southan, A., Rowan, E.G., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. 2005. Pharmacological and structural characterization of a novel Belo, Font

phospholipase A 46(7), 736-7350. A2 from Micrurus dumerilii carinicauda venom. Toxicon

- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A. & Del Rio, J. A. (1997). Uses and Properties of Citrus Flavonoids. J. Agric Food Chem. A. (1997). Uses 45, 4505-4515.
- Benavente-García, O. and Castillo, J. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J. Agric Food Chem. 56(15), 6185-6205.
- Boilard, E., Rouault, M., Surrel, F., Le Calvez, C., Bezzine, S., Singer, A., Gelb, M.H. and Lambeau, G. 2006. Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. Biochemistry 45(44), 13203-13218.
- Burke, J.E. & Dennis, E.A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. J. Lipid Res., 50, S237-S242.
- Câmara, P.R., Esquisatto, L.C., Camargo, E.A., Ribela, M.T., Toyama, M.H., Marangoni, S., De Nucci, G. and Antunes, E. 2003. Inflammatory oedema induced by phospholipases A2 isolated from *Crotalus durissus sp.* in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. Toxicon 41(7), 823-829.
- Cardoso, D.F., Lopes-Ferreira, M., Faquim-Mauro, E.L., Macedo, M.S. and Farsky, S.H. (2001). Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from Crotalus durisus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. Mediators Inflamm. 10(3): 125-133.
- Cavalcanti, L.P. & Torriani, I.L. (2004). Two new sealed sample cells for small angle x-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation. Review of Scientific Instruments, 75, 4541-4546.
- CCP4 (2002). High-throughput structure determination. Proceedings of the 2002 CCP4 (Collaborative Computational Project in Macromolecular Crystallography) Study Weekend. January, 2002. York, United Kingdom. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 58, 1897-1970
- Cirino, G. 1998. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. Biochem Pharmacol. 55(2), 105-111.
- Dal Belo, C.A., Toyama, M.H., Toyama, D., Marangoni, S., Moreno, F.B., Cavada, B.S., Fontana, M.D., Hyslop, S., Carneiro, E.M. and Boschero, A.C. (2005). Determination of the amino acid sequence of a new phospholipase A(2) (MIDCA1) isolated from Micrurus dumerilii carinicauda venom. Protein Journal 24(3), 147-153.
- de Castro, R.C., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G. and Antunes, E. (2000). Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. Toxicon, 38(12): 1773-1785.
- de Oliveira, D.G., Toyama, M.H., Martins, A.M., Havt, A., Nobre, A.C., Marangoni, S., Câmara, P.R., Antunes, E., de Nucci, G., Beliam, L.O., Fonteles, M.C. and Monteiro, H.S. 2003. Structural and biological - 17 -
- pta, C., Katsumata, M., Goldman, A.S., Herold, R. and Piddington, R. (2001). Glucocorticoid-Induced Phospholipase A2-inhibitory Proteins Mediate Glucocorticoid Teratogenicity in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81(4). Gupta 1140-1143
- Gutiérrez, J.M. And Ownby, C.L. (2003).Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon 42(8), 915-931.
- Hammersley, A. P., Svensson, S. O., Hanfland, M., Fitch, A. N. & Hausermann, D., 1996. Two-dimensional detector software: from real detector to idealised image or two-theta scan. High Pressure Res., 14, occord. M., Fitch, A. N. & software: from real
- Hanasaki, K. and Arita, H. (1999). Biological and Pathological Functions of Phospholipase A2 Receptor. Archives of Biochemistry and Biophysics 372(2), 215-223.
- Hernandez-Oliveira, S., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Hyslop, S. and Rodrigues-Simioni, L. 2005. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. Protein J. 24(4), 233-242.
- dek, P., Trefil, P. & Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent versatile biologically active compounds interacting with cytoch P450. Chemico-Biological Interactions, 139, 1-21. Hodek. cytochromes
- Huang, T.C., Toraya, H., Blanton, T.N. & Wu, Y. (1993). X-ray Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard. J. Appl. Cryst., 26, 180-184.
- Iglesias, C.V., Aparicio, R., Rodrigues-Simioni, L., Camargo, E.A., Antunes, E., Marangoni, S., Toyama, D.O., Beriam, L.O.S., Monteiro, H.S.A. & Toyama, M.H. (2005). Effects of morin on snake venom phopholipase A2 (PLA2). Toxicon, 46, 751-758.
- nes, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol., 292, 195-202. Jones,
- llermann, G., Vicentin, F., Tamura, E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., Craievich, A., & Torriani, I. (1997). The Small-Angle X-ray Scattering Beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. J. Appl. Cryst., 30, 880-883.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J. & Svergun, D.I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Cryst., 36, 1277-1282.
- Kozin, M.B. & Svergun, D.I. (2001). Automated matching of high- and low-resolution structural models. J. Appl. Cryst., 34, 33-41.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. 372, 774-797.
- Lee, W.H., Toyama, M.H., Soares, A.M., Giglio, J.R., Marangoni, S. and Polikarpov, I. 1999. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A2 from the venom of

characterization of a crotapotin isoform isolated from Crotalus durissus cascavella venom. Toxicon 42(1),53-62.

- Diaz-Oreiro, C. and Gutiérrez, 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(2):241-52.
- Diz Filho, E.B., Marangoni, S., Toyama, D.O., Fagundes, F.H., Oliveira, S.C., Fonseca, F.V., Calgarotto, A.K., Joazeiro, P.P. and Toyama, M.H. 2009. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of Crotalus durissus ruruima. Toxicon 53(1), 104-114
- Santos, M.L., Fagundes, F.H.R., Teixeira, B.R.F., Toyama, M.H., Aparicio, R. (2008). Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from B. Jararacussu. Int. J. Mol. Sci., 9, 736-750.
- Fawzy, A.A., Vishwanath, B.S. and Franson, R.C. 1988. Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A2 by retinoids and flavonoids. Mechanism of action. Agents Actions. 25(3-4), 394-400.
- Fischer, H., Neto, M.O., Napolitano, H.B. Craievich, A.F., Polikarpov, I. 2009. The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale. J Appl Crystallogr, 43(1):101-109.
- Fonseca, F.V., Antunes, E., Morganti, R.P., Monteiro, H.S., Martins, A.M., Toyama, D.O., Marangoni, S. and Toyama, M.H. 2006. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin Crotalus durissus cascavella venom. Protein J. 25(3):183-192.
- Fuente, L., Hernández, M., Nieto, M.L. And Crespo, M.S. (2002). Biological effects of group IIA secreted phosholipase A2. FEBS Letter 531(1), 7 -

Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimarães, J.A. and Melo, P.A. (2000). Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from Lachesis muta (Bushmaster) snake venom. Toxicon 38(7), 961-972.

- Gil, B., Sanz, M.J., Terencio, M.C., Gunasegaran, R., Payá, M.and Alcaraz, M.J. 1997. Mozelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. Biochem Pharmacol. 53(5),733-740
- Giotto, M.T.S., Garratt, R.C., Oliva, 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 Bothropstoxin I, a Dimeric Lys49-Phospholipase A2 Homologue. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 30, 442-454.
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O. and Pelzer, L.E. 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Farmaco 56(9), 683-687.
- Guinier, A. & Fournet, G. (1955). Small-angle scattering of X-rays, John Wiley & Sons, New York

- 18 -

Bothrops pirajai. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 55(Pt 6), 1229-1230.

- vitt, M., Gerstein, M., Huang, E., Subbiah, S. & Tsai, Jerry. (1997). Protein Folding: The Endgame. Annu. Rev. Biochem. 66, 549-579. Levitt. M .
- Lindahl, M. and Tagesson, C. (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of inhibition of group II phospholipase A2. Inflammation 21(3),347-356.
- agro, A.J., Takeda, A.A.S., 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(Pt 12):1670-1677. Magro,
- Marchi-Salvador, D.P., Corrêa, L.C., Magro, A.J., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Fontes, M.R. (2008). Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from Crotalus durissus terrificus venom. Proteins 72(3),883-891.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics, 16, 404-405.
- Middleton Jr, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells:Implications for Inflamm Heart Disease, and Cancer. Pharmacological Reviews 52(4), 673-751. for Inflammation,
- 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.
- Nevalainen, T.J., Graham, G.G. and Scott, K.F. 2008. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. Biochim Biophys Acta. 1781(1-2), 1-9.
- Oliveira, D.O., Marangoni, S., Diz-Filho, E.B., Oliveira, S.C. and Toyama, M.H. 2009. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (SPLA2) isolated from Crotalus durissus collilineatus venom. Toxicon 15, 417-426.
- Oliveira, S.C., Fonseca, F.V., Antunes, E., Camargo, E.A., Morganti, R.P., Aparicio, R., Toyama, D.O., Beriam, L.O., Nunes, E.V., Cavada, B.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Nascimento, K.S. and Toyama, M.H. 2008. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the Bryothamnion triquetrum red alga. BMC Biochem.9, 16.
- Panda, B.C., 1970. Low-angle X-ray investigation of macromolecules -proteins. J. Phys. D: Appl. Phys., 3, 815-828.
- Petoukhov, M.V. & Svergun, D.I. (2005). Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. Biophys J., 89, 1237-1250.

- Ponder, J.W. & Richards, F.M. (1987). Tertiary Templates for Proteins. Use of Packing Criteria in the Enumeration of Allowed Sequences for Different Structural Classes. J. Mol. Biol. 193, 775-791.
- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L. & Tainer J.A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. Q. Rev. Biophys., 40, 191-285.
- Rigden, D.J., Hwa, L.W., Marangoni, S., Toyama, M.H. and Polikarpov, I. 2003. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 59(Pt 2):255-262.
- Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., de la Rocha, N.E. and Pelzer, L.E. 2003. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. Pharmacol Res. 48(6),601-606.
- Santi-Gadelha, T., Rocha, B.A., Oliveira, C.C., Aragão, K.S., Marinho, E.S., Gadelha, C.A., Toyama, M.H., Pinto, V.P., Nagano, C.S., Delatorre, P., Martins, J.L., Galvani, F.R., Sampaio, A.H., Debray, H. and Cavada, B.S. 2008. Purification of a PHA-like chitin-binding protein from Acacia farnesiana seeds: a time-dependent oligomerization protein. Appl Biochem Biotechnol. 150(1):97-111.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research, 31, 3381-3385.
- Semisotnov, G.V., Kihara, H., Kotova, N.V., Kimura, K., Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Serdyuk, I.N., Timchenko, A.A., Chiba, K., Nikaido, K., Ikura, T. & Kuwajima, K. (1996). Protein Globularization During Folding. A Study by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering. J. Mol. Biol., 262, 559-574.
- Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homsi-Brandeburgo, M.I., Toyama, M.H., Lombardi, F.R., Arni, R.K. and Giglio, J.R. 1998. 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 36(3), 503-514.
- Svergun, D.I. (1992). Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. J. Appl. Cryst., 25, 495-503.
- Svergun, D.I., Barberato, C. & Koch, M.H.J. (1995). CRYSOL a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. J. Appl. Cryst., 28, 768-773.
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V. & Koch, M.H.J. (2001). Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. Biophysical Journal, 80, 2946-2953.
- Svergun D.I. & Koch M.H.J. (2002). Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. Current Opinion in Structural Biology, 12, 654-660.

- 21 -

Figure 1. a) Absorption spectra of the sPLA2 and modified sPLA2 after incubation with naringin at wavelength intervals of 200-300 nm. The amino acid modification was analyzed at 280 nm. b) Amino acid composition of non-treated and treated sPLA2 with naringin (sPLA2-Nar), UNK indicates unknown or unidentified peak or extra peaks, identified by PICO-TAG amino acid analyze system.

- Svergun, D.I. & Koch, M.H.J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. Rep. Prog. Phys., 66, 1735-1782.
- Tang, L., Zhou, Y. & Lin, Z. (1999). Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit. Acta Cryst. Section D, D55, 1986-1996.
- Toyama, M.H., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira, B. and Marangoni, S. 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from Bothrops pirajai snake venom. Nterminal sequencing. Biochem Mol. Biol. Int. 37(6), 1047-1055.
- Toyama, M.H., de Oliveira, D.G., Beriam, L.O., Novello, J.C., Rodrigues-Simioni, L. and Marangoni, S. 2003. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from Crotalus durissus terrificus venom. Toxicon 41(8),1033-1038.
- Toyama, M.H., Toyama, D.O., Joazeiro, P.P., Carneiro, E.M., Beriam, L.O., Marangoni, L.S. and Boschero, A.C. 2005. Biological and structural characterization of a new PLA2 from the Crotalus durissus collilineatus venom. Protein J. 24(2), 103-112.
- Toyama, M.H., Toyama, D. de O., Passero, L.F., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Tomokane, T.Y., Fonseca, F.V., Antunes, E., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O., Martins, M.A., Monteiro, H.S. and Fonteles, M.C. 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from Crotalus durissus cascavella venom. Toxicon 47(1), 47-57.
- Tsutakawa, S.E., Hura, G.L., Frankel, K.A., Cooper, P.K. & Tainer, J.A. 2007. Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle X-ray scattering combined with crystallography. J. Struct. Biol., 158, 214-223.
- Tsuruta, H. & Johnson, J.E., 2001. Small-angle X-ray scattering, In: International Tables for Crystallography F - Crystallography of biological macromolecules, edited by Rossmann, M.G. & Arnold, E. International Union of Crystallography.
- Vishwanath, B.S., Fawzy, A.A. and Franson, R.C. 1988. Edema-inducing activity of phospholipase A2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. Inflammation 12(6),549-561.
- Volkov, V.V. & Svergun, D.I. (2003). Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. J. Appl. Cryst., 36, 860-864.
- Ward, R.J., de Azevedo Jr, W.F. & Arni, R.K. (1998). At the interface: crystal structures of phospholipases A2. Toxicon, 36, 1623-1633.
- Wriggers, W., Milligan, R. A., and McCammon, J. A. (1999). Situs: A Package for Docking Crystal Structures into Low-Resolution Maps from Electron Microscopy. J. Structural Biology, 125, 185-195.

- 22 -

Figure 2. a) CD spectra of native *C. d. cascavella* phospholipase A2 (sPLA2) and sPLA2 treated with naringin (sPLA2-Nar). Data over the range 185-300 nm are shown. The CD spectra are expressed in ellipticity units in millidegrees. b) The mass measurement of native and naringin treated sPLA2 by MALDI-TOFF mass spectrometry resulting in a molecular mass of 14,678.14 Da for native sPLA2 and 14,687.34 Da for naringin treated (sPLA2-Nar).





Figure 3. a) Enzymatic activity increase in absorbance by increase in chromogenic product (p-anilide), the measurement of product was carried out using an ELISA system and wavelength at 425 nm. The sPLA2 treated with naringin (sPLA2-Nar) showed a significant decrease if compared to non-treated sPLA2 and similar to sPLA2 treated with 4-bromophenacyl bromide (sPLA2-PBEP) (n-12, *PC0.05). b) Measurement of creatine kinase activity from the samples of animals treated with saline (negative control), native sPLA2 (sPLA2; 50µL, 50µg) and naringin treated sPLA2 (sPLA2-Nar; 50µL, 50µg). The last bar represents the effect of sPLA2 treated with pBPB (50 µL, 50µg). Results of creatine kinase levels were expresses as units of enzymatic activity by liter (U/L) of blood and each column of 6 animals and each bar indicate SEM. *P<0.05 compared with saline control. c) Neurotoxic effect of sPLA2 and sPLA2-Nar on the chick biventer cervicis preparation. Results were expressed as modification of twitch tension in percentage, each point represent mean i SEM of five preparation and *P<0.05. d) The washed platelets assay was performed with venous blood collected from healthy volunteers. The blood was centrifuged in 3.8% trisodium-citrate for 10 minutes at 200g and the residue was centrifuged again for 20 minutes at 1500g. Aggregations were performed using native sPLA2 and sPLA2-NAr.



Figure 5. a) Effect of Naringin (sPLA2-Nar) on the sPLA2 antibacterial activity against *Staphylococcus mutans*. b) Observed structural modifications induced by sPLA2 and sPLA2-Nar on the *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*. Saline conditions correspond to the control experiments. CFU is an acronym to colony formation units.





- 26 -

Figure 6. Small Angle X-ray Scattering data plots. a) Experimental scattering curves and Guinier region with its linear data fit (red line). b) Distance distribution functions, p(r). c) Kratky plot. Blue squares represent the SAXS data for the native protein (sPLA2, -4 mg/mL) and the SAXS data for the protein after treatment with naringin (sPLA2-Nar, ~7 mg/mL) are shown as gray circles.





Figure 7. Superposition of the dimeric high resolution model for agkistrodotoxin sPLA2 (PDB entry 1BJJ, chains A and E, shown in orange as cartoon) and SAXS envelopes. a) Native low resolution model obtained is shown in blue. b) The envelope to the protein after treatment with naringin is shown in gray. Envelopes (left) are rotated clockwise by 90° around the y- (middle) and z-axes (right). Figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).

Figure 8. Stereo cartoon representation of the C. d. cascavella sPLA2 dimer modeled with SWISS-MODEL and built in silico based on the high resolution model of agkistrodotoxin sPLA2 (PDB entry 1BJJ, chains A and E). All aromatic amino acid residues, histidines and serines are shown in ball and sticks representation. Those PHE, TYR, TRP, HIS and SER residues present in the interface region are highlighted in yellow. Catalytic triad residues (GIX31, HIS47 and ASP89) are shown in red. Figure was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, http://www.pymol.org).





- 29 -

- 30 -
Apêndice B

Atividades acadêmicas, cursos e eventos científicos

Além da pesquisa desenvolvida durante os trabalhos desta tese também participamos de diferentes atividades acadêmicas, cursos e congressos científicos que são apresentados a seguir:

B.1 – Atividades acadêmicas

Disciplinas :

- 1° Sem/2006 Métodos Físicos em Química Orgânica (QP222): conceito
- A, 180 horas e 12 créditos.

 1° Sem/2006 - Tópicos Especiais em Físico-Química X (QP934) "Análise Multivariada de Dados Químicos": conceito A, 180 horas e 12 créditos.

2° Sem/2006 - Tópicos Especiais em Química Interdisciplinar I (QP663)
"Métodos Modernos de Caracterização Estrutural e Dinâmica de Proteínas": conceito A, 180 horas e 12 créditos.

1° **Sem/2007 -** Tópicos Especiais em Físico-Química IV (QP436) "Fotoquímica e Fotofísica em Biomoléculas": conceito A, 45 horas e 3 créditos.

1° Sem/2007 - Tópicos Especiais em Físico-Química XI (QP935) "Crista-

lografia Estrutural: aplicação a pequenas moléculas e proteínas": conceito A, 180 horas e 12 créditos.

2° **Sem/2008 -** Bioinformática Estrutural (NG250): conceito A, 180 horas e 12 créditos.

Exames :

25/05/2006 - Exame de aptidão em língua inglesa: aprovado.

13/07/2007 - Exame de qualificação geral de doutorado. Estratégias de Clonagem e Expressão de Proteínas de Eucariotos: aprovado.

07/02/2009 - *International English Language Testing System* (IELTS): band 7.

02/12/2009 - Exame de qualificação de área de doutorado. Estudos Estruturais de Proteínas de Cana-de-açúcar, de Milho e de Venenos de Serpentes, por Cristalografia e Análises em Solução: aprovado.

B.2 – Cursos e eventos científicos

Cursos :

09/2006 - Second Brazil School for Single Particle Cryo Electron Microscopy (Araraquara, São Paulo).

05/2007 - Bioquímica dos venenos de animais (XXXVI Reunião da SBBq). **05/2007 -** Proteômica: tornando mais fácil a análise de proteínas (Invitrogen na XXXVI SBBq).

01/**2009 -** *CCP4* Study Weekend: Experimental Phasing and Radiation Damage (University of Nottingham, UK).

03/**2009** - Joint ICTP/IAEA School on Novel Synchrotron Radiation Applications (the Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics).

03/2009 - Aplicação da metodologia QSAR-4D usando o programa LQTA-QSAR (Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada, IQ/UNICAMP).

Eventos científicos :

05/2006 - 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

07/2006 - XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

02/2007 - 17^{*a*} Reunião Anual de Usuários (RAU) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

02/2007 - II Workshop em Biologia Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

05/**2007** - XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).

09/2007 - 18^{*a*} Reunião da Associação Brasileira de Cristalografia (ABCr). **05/2008 -** XXXVII *Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology* (SBBq).

02/2009 - 19^{*a*} Reunião Anual de Usuários (RAU) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

10/2009 - 5th International Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (X-meeting).

Apresentações de trabalhos :

07/2006 - PAINEL: *Structural studies of snake venom PLA2 in the presence of flavonoids* (XXXV SBBq).

09/2006 - ORAL: Effect of Flavonoids in the Structure of Snake Venon Phospholipase A2 (Second Brazil School for Single Particle Cryo Electron Microscopy).

05/2007 - PAINEL: *Small-Angle X-Ray Scattering* (SAXS) *Studies of a Basic Leucine Ziper* (bZIP) *SCF5 Transcription Factor from Sugarcane* (XXXVI *Annual Meeting of* SBBq).

09/2007 - PAINEL: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two crystal forms of a new basic Lys49 PLA2 from Bothrops jararacussu (18^a Reunião da ABCr).

B.2 Cursos e eventos científicos

02/2008 - PAINEL: Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of a New Basic Pla2 (F17) from Crotalus durissus terrificus (XXXVII Annual Meeting of SBBq).

10/2009 - PAINEL: Structural studies of a new Lys49-PLA2 from Bothrops jararacussu (BjVIII) using X-ray diffraction crystallography and bioinformatic tools (5th X-meeting).

Referências Bibliográficas

- [1] D. Whitford, Proteins: structure and function. Wiley, 2005.
- [2] D. Corrêa and C. Ramos, "The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function," *African Journal of Biochemistry Research*, vol. 3, pp. 164–173, 2009.
- [3] N. Berova, K. Nakanishi, and R. Woody, *Circular dichroism: principles and applications*. VCH Verlagsgesellschaft, 2000.
- [4] G. Fasman, *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Plenum Publ Corp, 1996.
- [5] N. Sreerama and R. Woody, "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism," *Analytical Biochemistry*, vol. 209, pp. 32–44, 1993.
- [6] S. Kelly, T. Jess, and N. Price, "How to study proteins by circular dichroism," BBA-Proteins and Proteomics, vol. 1751, pp. 119–139, 2005.
- [7] S. Kelly and N. Price, "The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1338, pp. 161–185, 1997.
- [8] N. Sreerama and R. Woody, "Computation and analysis of protein circular dichroism spectra," *Methods in Enzymology*, vol. 383, pp. 318–351, 2004.
- [9] M. Andrade, P. Chacon, J. Merelo, and F. Moran, "Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network," *Protein Engineering Design and Selection*, vol. 6, pp. 383–390, 1993.
- [10] N. Sreerama and R. Woody, "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set," *Analytical Biochemistry*, vol. 287, pp. 252–260, 2000.

- [11] A. Lobley, L. Whitmore, and B. Wallace, "DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra," *Bioinformatics*, vol. 18, pp. 211–212, 2002.
- [12] I. van Stokkum, H. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle, and F. Groen, "Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra," *Analytical Biochemistry*, vol. 191, pp. 110–118, 1990.
- [13] B. Bulheller and J. Hirst, "DichroCalc–circular and linear dichroism online," *Bioin-formatics*, vol. 25, pp. 539–540, 2009.
- [14] L. McGuffin, K. Bryson, and D. Jones, "The PSIPRED protein structure prediction server," *Bioinformatics*, vol. 16, pp. 404–405, 2000.
- [15] M. Koch, P. Vachette, and D. Svergun, "Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution," *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 36, pp. 147–227, 2003.
- [16] D. Svergun and M. Koch, "Small-angle scattering studies of biological macromolecules," *Reports on Progress in Physics*, vol. 66, pp. 1735–1782, 2003.
- [17] D. Svergun and M. Koch, "Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, pp. 654–660, 2002.
- [18] D. Svergun, "Small-angle scattering studies of macromolecular solutions," *Applied Crystallography*, vol. 40, pp. s10–s17, 2007.
- [19] P. Vachette and D. Svergun, Small-angle x-ray scattering by solutions of biological macromolecules. In "Structure and dynamics of biomolecules". Oxford Univ Press, 2000.
- [20] O. Glatter and O. Kratky, Small angle X-ray scattering. Academic Press, 1982.
- [21] A. Guinier, G. Fournet, C. Walker, and K. Yudowitch, Small-angle scattering of Xrays. Wiley, 1955.
- [22] G. Semisotnov, H. Kihara, N. Kotova, K. Kimura, Y. Amemiya, K. Wakabayashi, I. Serdyuk, A. Timchenko, K. Chiba, K. Nikaido, T. Ikura, and K. Kuwajima, "Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering," *Journal of Molecular Biology*, vol. 262, pp. 559–574, 1996.
- [23] C. Putnam, M. Hammel, G. Hura, and J. Tainer, "X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution," *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 40, pp. 191–285, 2007.
- [24] J. Plestil, H. Pospisil, Y. Ostanevich, and G. Degovics, "Molecular-weight determination from small-angle scattering without absolute intensities: advantages and limitations," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 24, pp. 659–664, 1991.

- [25] G. Semisotnov, A. Timchenko, B. Melnik, K. Kimura, and H. Kihara, "Kratky plot as a tool to evaluate the molecular mass of globular proteins," *Photon Factory Activity Report*, vol. 20, p. 256, 2002.
- [26] H. Fischer, O. Neto, H. Napolitano, I. Polikarpov, and A. Craievich, "Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 43, pp. 101–109, 2009.
- [27] C. Oliveira, "TRAT1D: Computer Program for SAXS Data Treatment," LNLS Technical Manual MT01/2003, 2003.
- [28] A. Hammersley, "FIT2D: an introduction and overview," European Synchrotron Radiation Facility Internal Report ESRF97HA02T, 1997.
- [29] P. Konarev, M. Petoukhov, V. Volkov, and D. Svergun, "ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 39, pp. 277–286, 2006.
- [30] P. Konarev, V. Volkov, A. Sokolova, M. Koch, and D. Svergun, "PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 36, pp. 1277–1282, 2003.
- [31] D. Svergun, "Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 25, pp. 495–503, 1992.
- [32] D. Svergun, M. Petoukhov, and M. Koch, "Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering," *Biophysical Journal*, vol. 80, pp. 2946– 2953, 2001.
- [33] V. Volkov and D. Svergun, "Uniqueness of ab initio shape determination in smallangle scattering," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 36, pp. 860–864, 2003.
- [34] D. Svergun, C. Barberato, and M. Koch, "CRYSOL-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates," *Journal* of Applied Crystallography, vol. 28, pp. 768–773, 1995.
- [35] M. Kozin and D. Svergun, "Automated matching of high-and low-resolution structural models," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 34, pp. 33–41, 2001.
- [36] A. McPherson, *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Lab, 1999.
- [37] J. Tsai, R. Taylor, C. Chothia, and M. Gerstein, "The packing density in proteins: standard radii and volumes," *Journal of Molecular Biology*, vol. 290, pp. 253–266, 1999.

- [38] J. Jancarik and S. Kim, "Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 24, pp. 409–411, 1991.
- [39] T. Bergfors, *Protein crystallization: techniques, strategies, and tips: a laboratory manual.* Intl Univ Line, 1999.
- [40] N. Chayen, "Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 54, pp. 8–15, 1998.
- [41] T. Bergfors, "Seeds to crystals," *Journal of Structural Biology*, vol. 142, pp. 66–76, 2003.
- [42] Z. Dauter, "Current state and prospects of macromolecular crystallography," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 62, pp. 1–11, 2005.
- [43] A. Gonzalez, "Optimizing data collection for structure determination," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 59, pp. 1935–1942, 2003.
- [44] Z. Dauter, "Data-collection strategies," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 55, pp. 1703–1717, 1999.
- [45] P. Evans, "Some notes on choices in data collection," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 55, pp. 1771–1772, 1999.
- [46] G. Bourenkov and A. Popov, "A quantitative approach to data-collection strategies," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 62, pp. 58–64, 2005.
- [47] F. Winkler, C. Schutt, and S. Harrison, "The oscillation method for crystals with very large unit cells," *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography*, vol. 35, pp. 901–911, 1979.
- [48] E. Garman and R. Owen, "Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 62, pp. 32–47, 2005.
- [49] G. Petsko, "Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryo-protective mother liquors for protein crystals," *Journal of Molecular Biology*, vol. 96, pp. 381– 388, 1975.
- [50] E. Garman and T. Schneider, "Macromolecular cryocrystallography," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 30, pp. 211–237, 1997.
- [51] T. Blundell and L. Johnson, *Protein crystallography*. Academic Press, 1976.
- [52] A. McPherson, Preparation and analysis of protein crystals. Wiley, 1982.
- [53] J. Drenth, Principles of protein X-ray crystallography. Springer Verlag, 1999.

- [54] C. Giacovazzo, Fundamentals of crystallography. Oxford Univ Press, 2002.
- [55] G. Rhodes, *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models.* Academic Press, 2006.
- [56] M. Rossmann and C. Van Beek, "Data processing," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 55, pp. 1631–1640, 1999.
- [57] M. Rossmann, A. Leslie, S. Abdel-Meguid, and T. Tsukihara, "Processing and postrefinement of oscillation camera data," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 12, pp. 570–581, 1979.
- [58] Z. Otwinowski, D. Borek, W. Majewski, and W. Minor, "Multiparametric scaling of diffraction intensities," *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, vol. 59, pp. 228–234, 2003.
- [59] P. Evans, "Scaling and assessment of data quality," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 62, pp. 72–82, 2005.
- [60] K. Diederichs and P. Karplus, "Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography," *Nature Structural Biology*, vol. 4, pp. 269–275, 1997.
- [61] G. Taylor, "The phase problem," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 59, pp. 1881–1890, 2003.
- [62] H. Hauptman, "Phasing methods for protein crystallography," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 7, pp. 672–680, 1997.
- [63] I. Usón and G. Sheldrick, "Advances in direct methods for protein crystallography," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 9, pp. 643–648, 1999.
- [64] Z. Dauter, M. Dauter, and E. Dodson, "Jolly SAD," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 58, pp. 494–506, 2002.
- [65] E. Dodson, "Is it jolly SAD?," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 59, pp. 1958–1965, 2003.
- [66] W. Hendrickson, "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation," *Science*, vol. 254, pp. 51–58, 1991.
- [67] S. Ealick, "Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 4, pp. 495–499, 2000.
- [68] D. Blow and M. Rossmann, "The single isomorphous replacement method," *Acta Crystallographica*, vol. 14, pp. 1195–1202, 1961.
- [69] M. Rossmann, "The molecular replacement method," Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, vol. 46, pp. 73–82, 1990.

- [70] P. Evans and A. McCoy, "An introduction to molecular replacement," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 1–10, 2007.
- [71] A. Giorgetti, D. Raimondo, A. Miele, and A. Tramontano, "Evaluating the usefulness of protein structure models for molecular replacement," *Bioinformatics*, vol. 21, 2005.
- [72] A. Lebedev, A. Vagin, and G. Murshudov, "Model preparation in MOLREP and examples of model improvement using X-ray data," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 64, pp. 33–39, 2007.
- [73] M. Isupov and A. Lebedev, "NCS-constrained exhaustive search using oligomeric models," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 90–98, 2007.
- [74] E. Dodson, "The befores and afters of molecular replacement," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 17–24, 2007.
- [75] G. Barton, "Sequence alignment for molecular replacement," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 25–32, 2007.
- [76] F. Long, A. Vagin, P. Young, and G. Murshudov, "BALBES: a molecularreplacement pipeline," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 125–132, 2007.
- [77] R. Keegan and M. Winn, "MrBUMP: an automated pipeline for molecular replacement," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 64, pp. 119–124, 2007.
- [78] G. Murshudov, A. Vagin, and E. Dodson, "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 53, pp. 240–255, 1997.
- [79] R. Read, "Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors," *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, vol. 42, pp. 140–149, 1986.
- [80] T. Jones and M. Kjeldgaard, "Electron-density map interpretation," *Methods in Enzymology*, vol. 277, pp. 173–208, 1997.
- [81] P. Emsley and K. Cowtan, "Coot: model-building tools for molecular graphics," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 60, pp. 2126–2132, 2004.
- [82] A. Brünger, "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures," *Nature*, vol. 355, pp. 472–475, 1992.
- [83] G. Kleywegt and A. Brünger, "Checking your imagination: applications of the free R value," *Structure*, vol. 4, pp. 897–904, 1996.

- [84] G. Kleywegt and T. Jones, "Homo Crystallographicus: Quo Vadis?," Structure, vol. 10, pp. 465–472, 2002.
- [85] A. Morris, M. MacArthur, E. Hutchinson, and J. Thornton, "Stereochemical quality of protein structure coordinates," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 12, pp. 345–364, 1992.
- [86] G. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, "Stereochemistry of polypeptide chain configurations," *Journal of Molecular Biology*, vol. 7, pp. 95–99, 1963.
- [87] S. Hovmoller, T. Zhou, and T. Ohlson, "Conformations of amino acids in proteins," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 58, pp. 768–776, 2002.
- [88] Collaborative Computational Project Number 4, "The CCP4 suite: programs for protein crystallography," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 50, pp. 760–763, 1994.
- [89] E. Dodson, M. Winn, and A. Ralph, "Collaborative computational project, number 4: Providing programs for protein crystallography," *Methods in Enzymology*, vol. 277, pp. 620–634, 1997.
- [90] A. Leslie, "Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data," *Joint CCP4+ ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, vol. 26, pp. 11–20, 1992.
- [91] P. Evans, "Scala," *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, vol. 36, pp. 22–24, 1997.
- [92] J. Navaza, "AMoRe: an automated package for molecular replacement," Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, vol. 50, pp. 157–163, 1994.
- [93] J. Navaza, "Implementation of molecular replacement in AMoRe," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 57, pp. 1367–1372, 2001.
- [94] A. Vagin and A. Teplyakov, "MOLREP: an automated program for molecular replacement," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 30, pp. 1022–1025, 1997.
- [95] R. Laskowski, M. MacArthur, D. Moss, and J. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 26, pp. 283–291, 1993.
- [96] I. Davis, L. Murray, J. Richardson, and D. Richardson, "MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pp. W615–W619, 2004.

- [97] I. Davis, A. Leaver-Fay, V. Chen, J. Block, G. Kapral, X. Wang, L. Murray, W. Bryan Arendall III, J. Snoeyink, J. Richardson, and D. Richardson, "MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, pp. W375–W383, 2007.
- [98] A. Melgarejo, J. Cardoso, F. França, F. Wen, C. Málaque, and V. Haddad Jr, Serpentes peçonhentas do Brasil. In "Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.". Sarvier, 2003.
- [99] M. Jorge and L. Ribeiro, "Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil," *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 36, pp. 66–77, 1990.
- [100] E. Rocha, M. Silva, W. Beraldo, and G. Rosenfeld, "Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin," *The American Journal of Physiology*, vol. 156, pp. 261–273, 1949.
- [101] D. Hanahan, M. Rodbell, and L. Turner, "Enzymatic formation of monopalmitoleyland monopalmitoyllecithin (lysolecithins)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 206, pp. 431–441, 1954.
- [102] L. van Deenen, G. de Haas, and C. Heemskerk, "Hydrolysis of synthetic mixed-acid phosphatides by phospholipase A from human pancreas," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 67, pp. 295–304, 1963.
- [103] A. Gambero, E. Landucci, M. Toyama, S. Marangoni, J. Giglio, H. Nader, C. Dietrich, G. De Nucci, and E. Antunes, "Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans," *Biochemical Pharmacology*, vol. 63, pp. 65–72, 2002.
- [104] C. Iglesias, R. Aparicio, L. Rodrigues-Simioni, E. Camargo, E. Antunes, S. Marangoni, D. Toyama, L. Beriam, H. Serra Azul Monteiro, and M. Toyama, "Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2)," *Toxicon*, vol. 46, pp. 751–758, 2005.
- [105] O. Benavente-Garcia, J. Castillo, F. Marin, A. Ortuno, and J. Del Rio, "Uses and properties of citrus flavonoids," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, pp. 4505–4515, 1997.
- [106] O. Castillo, "Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity," *Journal of Agricultural* and Food Chemistry, vol. 56, pp. 6185–6205, 2008.
- [107] A. Fawzy, B. Vishwanath, and R. Franson, "Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A2 by retinoids and flavonoids. Mechanism of action," *Inflammation Research*, vol. 25, pp. 394–400, 1988.

- [108] B. Vishwanath, A. Fawzy, and R. Franson, "Edema-inducing activity of phospholipase A 2 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid," *Inflammation*, vol. 12, pp. 549–561, 1988.
- [109] P. Hodek, P. Trefil, and M. Stiborová, "Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 139, pp. 1–21, 2002.
- [110] R. Arni and R. Ward, "Phospholipase A2 a structural review," *Toxicon*, vol. 34, pp. 827–841, 1996.
- [111] D. Six and E. Dennis, "The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization," *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1488, pp. 1–19, 2000.
- [112] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. Wilkins, R. Appel, and A. Bairoch, "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server," *The Proteomics Protocols Handbook*, vol. 112, pp. 571–607, 2005.
- [113] R. Arni, R. Ward, J. Gutiérrez, and A. Tulinsky, "Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 51, pp. 311–317, 1995.
- [114] M. dos Santos, F. Fagundes, B. Teixeira, M. Toyama, and R. Aparicio, "Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA2 from B. Jararacussu," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, pp. 736–750, 2008.
- [115] L. Tang, Y. Zhou, and Z. Lin, "Structure of agkistrodotoxin in an orthorhombic crystal form with six molecules per asymmetric unit," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 55, pp. 1986–1996, 1999.
- [116] E. Krissinel and K. Henrick, "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state," *Journal of Molecular Biology*, vol. 372, pp. 774–797, 2007.
- [117] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, and M. Peitsch, "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, pp. 3381– 3385, 2003.
- [118] D. Marchi-Salvador, L. Corrêa, A. Magro, C. Oliveira, A. Soares, and M. Fontes, "Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: Crystal structure of a tetrameric phospholipase A 2 formed by two isoforms of crotoxin B from Crotalus durissus terrificus venom," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 72, pp. 883–891, 2008.
- [119] R. Ward, W. De Azevedo, and R. Arni, "At the interface: crystal structures of phospholipases A2," *Toxicon*, vol. 36, pp. 1623–1633, 1998.

- [120] M. da Silva Giotto, R. Garratt, G. Oliva, Y. Mascarenhas, J. Giglio, A. Cintra, W. De Azevedo, R. Arni, and R. Ward, "Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys 49-phospholipase A2 homologue," *Proteins: Structure, Function & Genetics*, vol. 30, pp. 442–454, 1998.
- [121] M. Murakami, M. Viçoti, J. Abrego, M. Lourenzoni, A. Cintra, E. Arruda, M. Tomaz, P. Melo, and R. Arni, "Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues," *Toxicon*, vol. 49, pp. 378–387, 2007.
- [122] M. Petoukhov and D. Svergun, "Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data," *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 2, pp. 1237–1250, 2005.
- [123] W. Wriggers, R. Milligan, and J. McCammon, "Situs: a package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy," *Journal of Structural Biology*, vol. 125, no. 2-3, pp. 185–195, 1999.
- [124] M. Homsi-Brandeburgo, L. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, and J. Giglio, "Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin," *Toxicon*, vol. 26, pp. 615– 627, 1988.
- [125] A. Cintra, S. Marangoni, B. Oliveira, and J. Giglio, "Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 12, pp. 57–64, 1993.
- [126] D. Holland, L. Clancy, S. Muchmore, T. Ryde, H. Einspahr, B. Finzel, R. Heinrikson, and K. Watenpaugh, "The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-A resolution," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, pp. 17649–17656, 1990.
- [127] D. Scott, A. Achari, J. Vidal, and P. Sigler, "Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistridon piscivorus piscivorus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, pp. 22645–22657, 1992.
- [128] D. Scott and P. Sigler, "Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2," Advances in Protein Chemistry, vol. 45, pp. 53–88, 1994.
- [129] J. Maraganore, G. Merutka, W. Cho, W. Welches, F. Kezdy, and R. Heinrikson, "A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49," *The Journal* of *Biological Chemistry*, vol. 259, pp. 13839–13843, 1984.
- [130] W. Lee, M. da Silva Giotto, S. Marangoni, M. Toyama, I. Polikarpov, and R. Garratt, "Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2–a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 28–36, 2001.

- [131] A. Ambrosio, M. Nonato, H. de Araujo, R. Arni, R. Ward, C. Ownby, D. de Souza, and R. Garratt, "A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 7326–7335, 2005.
- [132] W. de Azevedo Jr, R. Ward, J. Gutierrez, and R. Arni, "Structure of a Lys49phospholipase A2 homologue isolated from the venom of Bothrops nummifer (jumping viper)," *Toxicon*, vol. 37, pp. 371–384, 1999.
- [133] W. De Azevedo, R. Ward, F. Canduri, A. Soares, J. Giglio, and R. Arni, "Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A2homologue from Bothrops pirajai venom," *Toxicon*, vol. 36, pp. 1395–1406, 1998.
- [134] A. Fuly, A. Soares, S. Marcussi, J. Giglio, and J. Guimarães, "Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from Bothrops jararacussu snake venom," *Biochimie*, vol. 86, pp. 731–739, 2004.
- [135] R. Kini and H. Evans, "Effects of snake venom proteins on blood platelets," *Toxicon*, vol. 28, pp. 1387–1422, 1990.
- [136] D. Koh, A. Armugam, and K. Jeyaseelan, "Snake venom components and their applications in biomedicine," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, pp. 3030– 3041, 2006.
- [137] H. Castro, D. Silva, C. Craik, and R. Zingali, "Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform?," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1547, pp. 183–195, 2001.
- [138] L. Wijeyewickrema, M. Berndt, and R. Andrews, "Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands," *Toxicon*, vol. 45, pp. 1051–1061, 2005.
- [139] J. Gerrard and P. Robinson, "Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1001, pp. 282–285, 1989.
- [140] D. Meyer zu Heringdorf and K. Jakobs, "Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism," *BBA-Biomembranes*, vol. 1768, pp. 923–940, 2007.
- [141] C. Demopoulos, R. Pinckard, and D. Hanahan, "Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, pp. 9355–9358, 1979.
- [142] W. Moolenaar, O. Kranenburg, F. Postma, and G. Zondag, "Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 9, pp. 168–173, 1997.

- [143] W. Moolenaar, "Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, pp. 12949–12952, 1995.
- [144] G. Mills and W. Moolenaar, "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, pp. 582–591, 2003.
- [145] B. Matthews, "Solvent content of protein crystals," *Journal of Molecular Biology*, vol. 33, pp. 491–497, 1968.
- [146] A. Magro, A. Soares, J. Giglio, and M. Fontes, "Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 311, pp. 713–720, 2003.
- [147] R. Speedy and M. Mezei, "Pentagon-pentagon correlations in water," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 89, pp. 171–175, 1985.
- [148] J. Carrasco, A. Michaelides, M. Forster, S. Haq, R. Raval, and A. Hodgson, "A onedimensional ice structure built from pentagons," *Nature Materials*, vol. 8, pp. 427– 431, 2009.
- [149] M. Teeter, "Water structure of a hydrophobic protein at atomic resolution: Pentagon rings of water molecules in crystals of crambin," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 81, pp. 6014–6018, 1984.
- [150] R. Maiti, G. Van Domselaar, H. Zhang, and D. Wishart, "SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pp. W590–W594, 2004.
- [151] S. Lok, R. Gao, M. Rouault, G. Lambeau, P. Gopalakrishnakone, and K. Swaminathan, "Structure and function comparison of Micropechis ikaheka snake venom phospholipase A 2 isoenzymes," *FEBS Journal*, vol. 272, pp. 1211–1220, 2005.
- [152] B. Lomonte, E. Moreno, A. Tarkowski, L. Hanson, and M. Maccarana, "Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, pp. 29867–29873, 1994.
- [153] I. Krizaj, D. Turk, A. Ritonja, and F. Gubensek, "Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 999, pp. 198–202, 1989.
- [154] M. Toyama, A. Soares, C. Vieira, J. Novello, B. Oliveira, J. Giglio, and S. Marangoni, "Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin fromBothrops pirajai snake venom, and its biological activity after alkylation withp-bromophenacyl bromide," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 17, pp. 713–718, 1998.

- [155] P. Spencer, S. Aird, M. Boni-Mitake, N. Nascimento, and J. Rogero, "A singlestep purification of bothropstoxin-1," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, pp. 1125–1127, 1998.
- [156] G. Kleywegt and T. Jones, "Databases in protein crystallography," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 54, pp. 1119–1131, 1998.
- [157] G. Kleywegt, K. Henrick, E. Dodson, and D. van Aalten, "Pound-Wise but pennyfoolish how well do micromolecules fare in macromolecular refinement?," *Structure*, vol. 11, pp. 1051–1059, 2003.
- [158] G. Kleywegt, "Crystallographic refinement of ligand complexes," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 63, pp. 94–100, 2006.
- [159] Z. Feng, L. Chen, H. Maddula, O. Akcan, R. Oughtred, H. Berman, and J. Westbrook, "Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules," *Bioinformatics*, vol. 20, pp. 2153–2155, 2004.
- [160] R. Puri, "Phospholipase A2: its role in ADP-and thrombin-induced platelet activation mechanisms," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 30, pp. 1107–1122, 1998.
- [161] D. Oliveira, M. Toyama, J. Novello, L. Beriam, and S. Marangoni, "Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from Crotalus durissus terrificus venom," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 21, pp. 161–168, 2002.
- [162] M. Toyama, D. de Oliveira, L. Beriam, J. Novello, L. Rodrigues-Simioni, and S. Marangoni, "Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from Crotalus durissus terrificus venom," *Toxicon*, vol. 41, pp. 1033–1038, 2003.
- [163] M. Rossmann and D. Blow, "The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit," *Acta Crystallographica*, vol. 15, pp. 24–31, 1962.
- [164] R. Grosse-Kunstleve and P. Adams, "Patterson correlation methods: a review of molecular replacement with CNS," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 57, pp. 1390–1396, 2001.
- [165] E. Whittaker and C. Taylor, *The stereographic projection*. University College Cardiff Press, 1984.
- [166] R. Crowther, "The Molecular Replacement Method," Gordon and Breach, pp. 173– 178, 1972.
- [167] W. Pearson and D. Lipman, "Improved tools for biological sequence comparison," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 85, pp. 2444–2448, 1988.
- [168] C. Do, M. Mahabhashyam, M. Brudno, and S. Batzoglou, "ProbCons: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment," *Genome Research*, vol. 15, pp. 330–340, 2005.

- [169] R. Schwarzenbacher, A. Godzik, S. Grzechnik, and L. Jaroszewski, "The importance of alignment accuracy for molecular replacement," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 60, pp. 1229–1236, 2004.
- [170] T. Kern and R. Engerman, "A mouse model of diabetic retinopathy," Archives of Ophthalmology, vol. 114, pp. 986–990, 1996.
- [171] J. Kinoshita and C. Nishimura, "The involvement of aldose reductase in diabetic complications," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 4, pp. 323–337.
- [172] C. Yabe-Nishimura, "Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications," *Pharmacological Reviews*, vol. 50, pp. 21– 33, 1998.
- [173] M. Burg and P. Kador, "Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 81, pp. 635–640, 1988.
- [174] S. Srivastava, K. Ramana, and A. Bhatnagar, "Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options," *Endocrine Reviews*, vol. 26, pp. 380–392, 2005.
- [175] M. Pfeifer, M. Schumer, and D. Gelber, "Aldose reductase inhibitors: the end of an era or the need for different trial designs?," *Diabetes*, vol. 46, pp. 82–89, 1997.
- [176] P. Oates and B. Mylari, "Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 8, pp. 2095– 2119, 1999.
- [177] S. de Sousa, L. Rosselli, E. Kiyota, J. da Silva, G. Souza, L. Peroni, D. Stach-Machado, M. Eberlin, A. Souza, K. Koch, P. Arruda, I. Torriani, and J. Yunes, "Structural and kinetic characterization of a maize aldose reductase," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 47, pp. 98–104, 2009.
- [178] J. Jez and T. Penning, "The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 130, pp. 499–525, 2001.
- [179] M. Blakeley, F. Ruiz, R. Cachau, I. Hazemann, F. Meilleur, A. Mitschler, S. Ginell, P. Afonine, O. Ventura, A. Cousido-Siah, M. Haertlein, A. Joachimiak, D. Myles, and A. Podjarny, "Quantum model of catalysis based on a mobile proton revealed by subatomic x-ray and neutron diffraction studies of h-aldose reductase," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 1844–1848, 2008.
- [180] J. Shaw and D. Dickinson, "Studies of sugars and sorbitol in developing corn kernels," *Plant Physiology*, vol. 75, pp. 207–211, 1984.
- [181] D. Doehlert, T. Kuo, and F. Felker, "Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize," *Plant Physiology*, vol. 86, pp. 1013– 1019, 1988.

- [182] J. Jez, M. Bennett, B. Schlegel, M. Lewis, and T. Penning, "Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily," *Biochemical Journal*, vol. 326, pp. 625– 636, 1997.
- [183] J. Baynes and S. Thorpe, "Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm," *Diabetes*, vol. 48, pp. 1–9, 1999.
- [184] E. Ellis, "Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 115, pp. 13–24, 2007.
- [185] A. Garcia-Perez, B. Martin, H. Murphy, S. Uchida, H. Murer, B. Cowley Jr, J. Handler, and M. Burg, "Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCI-mediated osmotic stress," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, pp. 16815–16821, 1989.
- [186] T. Penning, M. Burczynski, J. Jez, C. Hung, H. Lin, H. Ma, M. Moore, N. Palackal, and K. Ratnam, "Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones," *Biochemical Journal*, vol. 351, pp. 67–77, 2000.
- [187] K. Matsuura, H. Shiraishi, A. Hara, K. Sato, Y. Deyashiki, M. Ninomiya, and S. Sakai, "Identification of a principal mRNA species for human 3 α-hydroxysteroid dehydrogenase isoform (AKR1C3) that exhibits high prostaglandin D2 11-ketoreductase activity," *Journal of Biochemistry*, vol. 124, pp. 940–946, 1998.
- [188] J. Desmond, J. Mountford, M. Drayson, E. Walker, M. Hewison, J. Ride, Q. Luong, R. Hayden, E. Vanin, and C. Bunce, "The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs," *Cancer Research*, vol. 63, pp. 505–512, 2003.
- [189] D. Bauman, S. Steckelbroeck, and T. Penning, "The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action," *Drug News Perspect*, vol. 17, pp. 563–78, 2004.
- [190] K. Bohren, J. Page, R. Shankar, S. Henry, and K. Gabbay, "Expression of human aldose and aldehyde reductases," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, pp. 24031–24037, 1991.
- [191] E. Kiyota, S. de Sousa, M. dos Santos, A. da Costa Lima, M. Menossi, J. Yunes, and R. Aparicio, "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of maize aldose reductase," *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 63, pp. 990–992, 2007.
- [192] A. Hassell, G. An, R. Bledsoe, J. Bynum, H. Carter, S. Deng, R. Gampe, T. Grisard, K. Madauss, R. Nolte, W. Rocque, L. Wang, K. Weaver, S. Williams, G. Wisely, R. Xu, and L. Shewchuk, "Crystallization of protein-ligand complexes," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 63, pp. 72–79, 2006.

- [193] T. Dafforn, "So how do you know you have a macromolecular complex?," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 63, pp. 17–25, 2006.
- [194] C. Chung, "The use of biophysical methods increases success in obtaining liganded crystal structures," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 63, pp. 62–71, 2006.
- [195] M. Jackson, S. Chopra, R. Smiley, P. Maynord, A. Rosowsky, R. London, L. Levy, T. Kalman, and E. Howell, "Calorimetric Studies of Ligand Binding in R67 Dihydrofolate Reductase," *Biochemistry*, vol. 44, pp. 12420–12433, 2005.
- [196] A. Boraston, R. Warren, and D. Kilburn, "β-1, 3-Glucan Binding by a Thermostable Carbohydrate-Binding Module from Thermotoga maritima," *Biochemistry*, vol. 40, pp. 14679–14685, 2001.
- [197] K. Bohren, J. Brownlee, A. Milne, K. Gabbay, and D. Harrison, "The structure of Apo R268A human aldose reductase: hinges and latches that control the kinetic mechanism," *BBA-Proteins and Proteomics*, vol. 1748, pp. 201–212, 2005.
- [198] D. Wilson, K. Bohren, K. Gabbay, and F. Quiocho, "An unlikely sugar substrate site in the 1.65 A structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications," *Science*, vol. 257, pp. 81–84, 1992.
- [199] J. Brownlee, E. Carlson, A. Milne, E. Pape, and D. Harrison, "Structural and Thermodynamic Studies of Simple Aldose Reductase-Inhibitor Complexes," *Bioorganic Chemistry*, vol. 34, pp. 424–444, 2006.
- [200] P. Simpson, C. Tantitadapitak, A. Reed, O. Mather, C. Bunce, S. White, and J. Ride, "Characterization of two novel aldo-keto reductases from arabidopsis: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress," *Journal of Molecular Biology*, vol. 392, pp. 465–480, 2009.
- [201] T. Kubiseski, D. Hyndman, N. Morjana, and T. Flynn, "Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, pp. 6510–6517, 1992.
- [202] C. Grimshaw, K. Bohren, C. Lai, and K. Gabbay, "Human aldose reductase-rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme," *Biochemistry*, vol. 34, pp. 14356–14365, 1995.
- [203] R. Morris, A. Perrakis, and V. Lamzin, "ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps," *Methods in Enzymology*, vol. 374, pp. 229–244, 2003.

- [204] G. Kleywegt, "Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement," Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, vol. 52, pp. 842–857, 1996.
- [205] M. Winn, M. Isupov, and G. Murshudov, "Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 57, pp. 122–133, 2001.
- [206] H. Lin, "Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme," Organic & Biomolecular Chemistry, vol. 5, pp. 2541–2554, 2007.
- [207] J. Olsen, L. Pedersen, C. Christensen, O. Olsen, and A. Henriksen, "Barley aldose reductase: structure, cofactor binding, and substrate recognition in the aldo/keto reductase 4C family," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 71, pp. 1572–1581, 2008.
- [208] L. Kleczkowski, M. Geisler, I. Ciereszko, and H. Johansson, "UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks," *Plant Physiology*, vol. 134, pp. 912–918, 2004.
- [209] T. Heinekamp, A. Strathmann, M. Kuhlmann, M. Froissard, A. Muller, C. Perrot-Rechenmann, and W. Droge-Laser, "The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription," *The Plant Journal*, vol. 38, pp. 298–309, 2004.
- [210] S. Sculaccio, H. Napolitano, L. Beltramini, G. Oliva, E. Carrilho, and O. Thiemann, "Sugarcane Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase: Molecular Characterization of a Phosphate-independent PRS," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 26, pp. 301–315, 2008.
- [211] H. Napolitano, S. Sculaccio, O. Thiemann, and G. Oliva, "Preliminary crystallographic analysis of sugar cane phosphoribosylpyrophosphate synthase," Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, vol. 61, pp. 49–51, 2004.
- [212] C. Catani, A. Azzoni, D. Paula, S. Tada, L. Rosselli, A. de Souza, and T. Yano, "Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from Xylella fastidiosa," *Protein Expression and Purification*, vol. 37, pp. 320–326, 2004.
- [213] L. Rosselli, C. Oliveira, A. Azzoni, S. Tada, C. Catani, A. Saraiva, J. Soares, F. Medrano, I. Torriani, and A. Souza, "A new member of the aldo-keto reductase family from the plant pathogen Xylella fastidiosa," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 453, pp. 143–150, 2006.
- [214] A. Azzoni, S. Tada, L. Rosselli, D. Paula, C. Catani, A. Sabino, J. Barbosa, B. Guimarães, M. Eberlin, F. Medrano, and A. Souza, "Expression and purification of a small heat shock protein from the plant pathogen Xylella fastidiosa," *Protein Expression and Purification*, vol. 33, pp. 297–303, 2004.

[215] A. Saraiva, M. Reis, S. Tada, L. Rosselli-Murai, D. Schneider, A. Pelloso, M. Toledo, C. Giles, R. Aparicio, and A. de Souza, "Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from Xylella fastidiosa–evidence of allosteric behaviour," *FEBS Journal*, vol. 276, pp. 6751– 6762, 2009.