

# Estudos estruturais da formação oligomérica da crotoxina e seus complexos

## Structural studies of the oligomeric formation crotoxin and their complexes

Humberto A. S. Morelli<sup>1</sup>, Carlos A. H. Fernandes<sup>1</sup>, Ângelo J. Magro<sup>1</sup>, Marcos R. M. Fontes<sup>1</sup>, Renata N. Bicev<sup>2</sup>, Cristiano L. P. de Oliveira<sup>2</sup>, Marina B. Barioni<sup>3</sup>, Amando S. Ito<sup>3</sup> e Roberto M. Fernandez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Botucatu (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

### Resumo

A crotoxina é uma fosfolipase A<sub>2</sub> que é a principal responsável pelo efeito neurotóxico do veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavéis. Na crotoxina existem duas subunidades: uma ácida, não tóxica e desprovida de ação enzimática, (chamada de crotoxina A ou CA); e uma básica, tóxica com atividade enzimática (chamada de crotoxina B ou CB). O principal objetivo desse trabalho é estudo da CA, CB e do complexo CA+CB através das técnicas de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS), absorção óptica e fluorescência estática.

**Palavras-chave:** crotoxina, fosfolipases A<sub>2</sub>, relação estrutura-atividade.

### Abstract

The crotoxin is a phospholipase A<sub>2</sub> that is the mainly responsible for the neurotoxic effect of the snakes' venom of the species *Crotalus durissus*, popularly known as rattlesnakes. In the crotoxin there are two subunits: an acidic, non-toxic and devoid of enzymatic action, (called crotoxin A or CA); and a basic, toxic with enzymatic activity (called crotoxin B or CB). The main objective of this work is to study the CA, CB and the complex CA + CB using the Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), Optical absorption spectrometry and static fluorescence techniques.

**Keywords:** crotoxin, phospholipases A<sub>2</sub>, structure-activity relationship.

### Introdução

As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas no Brasil como cascavéis, estão representadas por uma única espécie com ampla distribuição geográfica, *Crotalus durissus*, que possui cinco subespécies, sendo as espécies *Crotalus durissus terrificus* e a *Crotalus durissus collilineatus* as mais conhecidas e estudadas<sup>1</sup>. O estudo do veneno dessas serpentes é especialmente relevante, uma vez que este gênero é responsável pelo maior número de óbitos em acidentes ofídicos e seu veneno possui pronunciadas atividades neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes, que acarretam em paralisias musculares, insuficiência respiratória, mioglobínúria e insuficiência renal aguda, principal causa de óbito nesses envenenamentos<sup>2,3</sup>. A ação neurotóxica, principal característica do veneno crotálico, é fundamentalmente produzida pela crotoxina, que é o

componente responsável pela alta toxicidade do veneno, representando até 60% do peso total do veneno bruto seco<sup>4</sup>. Além da crotoxina, outras neurotoxinas foram isoladas do veneno de *Crotalus*, como a crotamina, a giroxina e a convulxina, cujos efeitos, caracterizados experimentalmente, não são identificados nas manifestações do envenenamento humano<sup>3</sup>.

A crotoxina é uma fosfolipase A<sub>2</sub> neurotóxica e miotóxica com potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular através de uma ação pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, o que provoca paralisia motora e respiratória nos animais<sup>5-7</sup>. A crotoxina é um complexo heterodimérico composto por uma associação não-covalente entre duas subunidades: uma ácida que é conhecida como crotoxina A, CA ou crotapotina<sup>8,9</sup> e uma básica que é conhecida como crotoxina B ou CB<sup>10,11</sup>. Quando isoladas,

foi demonstrado que a CB possui uma ação tóxica e enzimática menor que a crotoxina e que a crotapotina não possui ação tóxica e nem atividade enzimática<sup>10</sup>. Esta grande variação pode ocorrer devido à modificações pós-traducionais que ocorreriam em uma molécula precursora da crotoxina ou da expressão de diferentes RNAs mensageiros presentes em um único indivíduo<sup>12</sup>. Duas dessas isoformas de crotoxina B (CB1 e CB2) foram isoladas a partir de uma biblioteca de cDNA preparada a partir de uma única glândula de veneno de *Crotalus durissus terrificus*<sup>12</sup>. O sequenciamento dos aminoácidos dessas duas isoformas mostra que elas diferem em oito resíduos, resultando em diferenças em suas propriedades enzimáticas e farmacológicas<sup>12</sup>. A isoforma CB1 se associa com alta afinidade a qualquer isoforma de CA resultando em uma crotoxina mais tóxica, mas enzimaticamente menos ativa que o complexo menos estável formado pela associação de CA com a isoforma CB2<sup>6,12</sup>. Nos últimos anos, a estrutura cristalográfica da crotoxina B de *Crotalus durissus terrificus* foi elucidada<sup>13</sup>. Essa estrutura é formada por um tetrâmero formado por dois dímeros. Cada dímero, por sua vez, é formado por um monômero da isoforma CB1 e por um monômero da isoforma CB2. Essa conformação dimérica/tetramérica pode potencializar a atividade neurotóxica da CB através da criação de novos sítios de ligação que aumentariam a afinidade da CB com a membrana pré-sináptica<sup>13</sup>. Apesar disso, ainda não se sabe como ocorre a interação da crotapotina com a crotoxina B para a formação do complexo crotoxina. Recentemente, foi elucidada a estrutura do complexo total da crotoxina (CA+CB), onde apenas uma molécula de CB se ligaria a CA e provavelmente esta atuaria como monômeros<sup>14</sup>. A fim de se obter informações estruturais acerca da oligomerização da CB e como seria a sua interação com a CA, foram usadas as técnicas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), de absorção óptica e fluorescência estática.

## Materiais e Métodos

Amostras de Crotoxina A (CA), Crotoxina B (CB) e o complexo CA+CB foram preparadas em solução tampão Tris HCl, pH = 8,0, e força iônica 20 mM.

Os experimentos de SAXS foram realizados no equipamento Nanostar™ – Bruker, localizado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP). As amostras foram analisadas a 25 °C com concentrações de aproximadamente 5 mg/mL. Estas foram acondicionadas em capilares de quartzo. Foram realizadas 27 aquisições de 600 s para cada amostra a fim de observar eventual degradação da amostra pela incidência de raio-X.

Os experimentos de absorção óptica e fluorescência estática foram realizados na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto (SP). As amostras foram analisadas a temperatura ambiente com

concentrações de aproximadamente 40 mM. Estas foram acondicionadas em cubetas de quartzo de caminho óptico 2 mm. Para as medidas de fluorescência, foi usado um comprimento de onda de excitação de 295 nm.

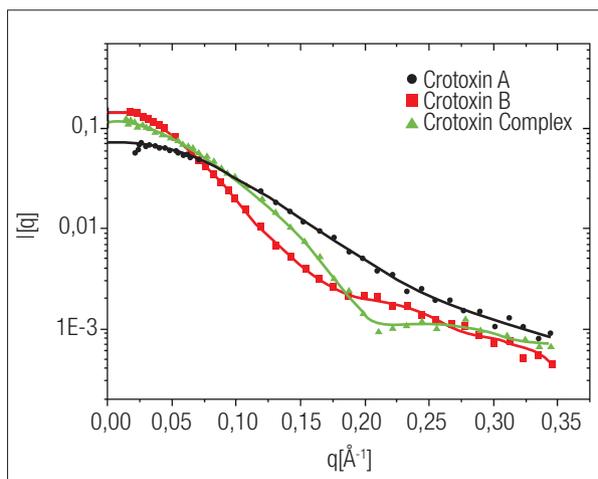
As funções distribuição de distâncias  $\rho(r)$  foram obtidas da transformada de Fourier indireta das curvas de espalhamento de raios-X, através de programa computacional desenvolvido por D. I. Svergun.

Absorção óptica foi usada para determinar o espectro de absorção das moléculas aqui estudadas. Para estas proteínas, a absorção de luz ocorre apenas para as ligações peptídicas, a fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp), com cada grupo molecular absorvendo num intervalo específico de comprimento de onda. Para a Phe, a absorbância máxima ocorre em 257 nm, para a Tyr em 274 nm, e para o Trp em 280 nm.

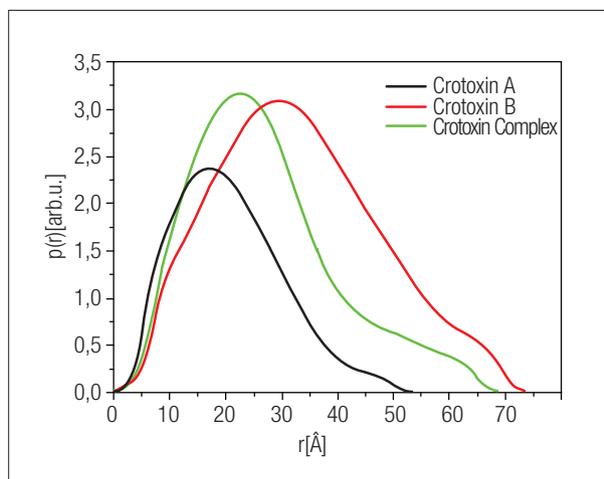
Fluorescência estática foi usada para detectar a intensidade de luz fluorescente emitida pela excitação do Trp constante em cada uma das moléculas estudadas. Luz polarizada na excitação e emissão das moléculas foram usadas para a determinação do grau de anisotropia das mesmas. Medidas de anisotropia dão informações sobre o tamanho e forma das proteínas e sua difusão rotacional. Quanto maior é o valor da anisotropia, menor é a difusão rotacional.

## Resultados

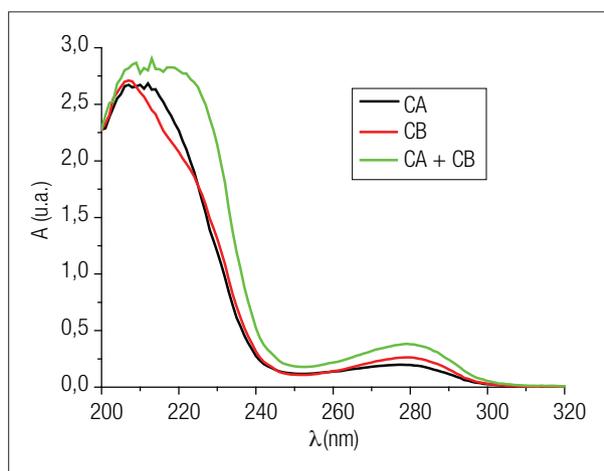
São apresentadas as Figuras 1 e 2, referentes as curvas da intensidade de espalhamento  $I(q)$  em função do vetor de espalhamento  $q$ , e as funções distribuição de distâncias  $\rho(r)$ , respectivamente, para as amostras CA, CB e o complexo CA+CB. Já a Figura 3 e 4 representam variação da absorbância  $A$  em função do comprimento de onda  $\lambda$  e a intensidade fluorescente do Trp em função do comprimento de onda de emissão  $\lambda$ , respectivamente. Já a Figura 5, apresenta a anisotropia fluorescente do Trp em função do comprimento de onda de emissão  $\lambda$ .



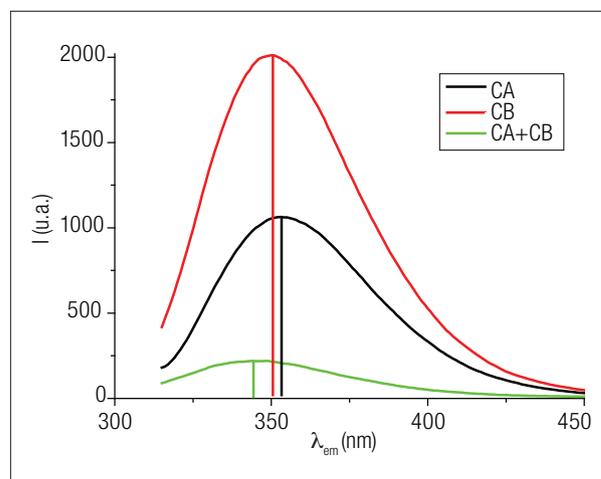
**Figura 1.** Curva de espalhamento de raio-X a baixo ângulo para as amostras CA, CB, e o complexo CA+CB.



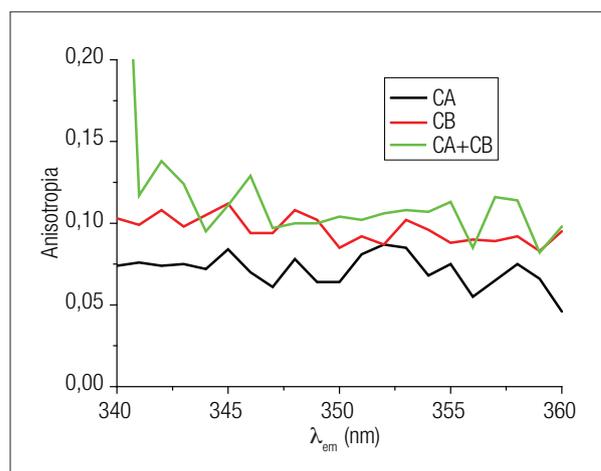
**Figura 2.** Função distribuição de distâncias para as amostras CA, CB, e o complexo CA+CB.



**Figura 3.** variação da absorvância A em função do comprimento de onda λ para as amostras CA, CB, e do complexo CA+CB.



**Figura 4.** A intensidade fluorescente do Trp em função do comprimento de onda de emissão I para as amostras CA, CB, e do complexo CA+CB.



**Figura 5.** Anisotropia fluorescente do Trp para as amostras CA, CB e o complexo CA+CB, diluídas em solução tampão Tris HCl.

## Discussão e Conclusões

Na Figura 1, através da transformada de Fourier indireta das curvas de espalhamento foi possível obter as funções distribuição de distâncias (ver Figura 2). Da Figura 2 observa-se que as amostras têm dimensão máxima de aproximadamente 55 Å para a CA, 75 Å para a CB e 70 Å para o complexo CA+CB. Além disso, o raio de giro obtido para a CA é de  $R_g = 16,35 \pm 0,05$  Å e o peso molecular de  $MW = 22 \pm 4$  kDa. Para a CB,  $R_g = 25,69 \pm 0,03$  Å e  $MW = 42 \pm 8$  kDa e para o complexo  $R_g = 21,37 \pm 0,05$  Å e  $MW = 35 \pm 7$  kDa.

Já com base na Figura 3, os espectros são resultantes da absorção das ligações peptídicas, da Phe, da Tyr e do Trp. As diferenças nos espectros observados entre as proteínas estudadas podem estar relacionadas as diferenças do ambiente molecular em que tais grupos absorvedores se encontram. Em relação a Figura 4, o valor máximo da intensidade fluorescente do complexo

é observado em 344 nm, e da CA e CB em torno de 351 nm. Tal diferença se deve à mudança do ambiente molecular do Trp. Isoladamente o Trp da CA e CB encontra-se num ambiente polar. Quando ambas as crotoxinas se complexam, o Trp é observado em um ambiente menos polar. A intensidade fluorescente da CB é maior que a CA. Isso está de acordo com a quantidade de Trp encontrado em cada uma das amostras (1 para CA e 3 para CB). No entanto, para o complexo, observa-se uma intensidade fluorescente muito menor do que as crotoxinas isoladas. Pode-se associar a uma elevação da taxa de decaimento não radiativo ou supressão colisional. Já em relação à Figura 5, a CA apresenta um valor médio aproximado de 0,75, a CB um valor médio de 0,95, e o complexo CA+CB um valor médio de 0,11, de acordo com o tamanho de cada proteína (maior proteína, menor movimento de difusão rotacional da mesma, e consequentemente maior é o valor da anisotropia).

A análise de SAXS mostra que o complexo possui uma dimensão máxima ligeiramente menor que a CB. Isso pode estar associado ao processo oligomerização do complexo, reduzindo assim o seu volume. Esse resultado também é observado por anisotropia de fluorescência que mostra valores médios da CB e complexo bastante similares. A análise das medidas de fluorescência mostra que na complexação das proteínas CA e CB, o *Trp* se dirige para um ambiente hidrofóbico, diferente de seu comportamento quando analisadas isoladas. Nesse processo de complexação, a mudança do ambiente molecular do *Trp* leva a uma redução da taxa de decaimento fluorescente devido a processos ainda não esclarecidos.

## Referências

- Melgarejo AR, Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Editors., Animais Peçonhentos no Brasil. São Paulo, Sarvier; 2003.
- Araújo FAA, Santalúcia M, Cabral RF, Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Editors., Animais Peçonhentos no Brasil. São Paulo, Sarvier; 2003.
- Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P, Acidente crotálico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Editors., Animais Peçonhentos no Brasil. São Paulo, Sarvier; 2003.
- Breithaupt H., Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex, *Toxicon*. 1976;14(3):221-33.
- Vital-Brasil O, Excell BJ, Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South America rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 1971;212:34-5.
- Faure G, Harvey AL, Thomson E, Saliou B, Radvanyi F, Bon C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur J Biochem*. 1993;214:491-6.
- Hawgood BJ, Smith JW. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotoxin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. *Br J Pharmacol*. 1977;61(4):597-606.
- Aird SD, Kaiser II. Comparative studies on three rattlesnake toxins. *Toxicon*. 1985;23(3):361-74.
- Aird SD, Yates JR, 3rd, Martino PA, Shabanowitz J, Hunt DF, Kaiser II. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1040(2):217-24.
- Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological roles of the two components of crotoxin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(7):1560-3.
- Aird SD, Kaiser II, Lewis RV, Kruggel WG, A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin., *Arch Biochem Biophys*. 1986;249(2):296-300.
- Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem* 1994;223(1):161-4.
- Marchi-Salvador DP, Correa 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 phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins*. 2008;72(3):883-91.
- Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. *J Mol Biol*. 2011;412(2):176-91.