

## BIOINFORMATICA ESTRUCTURAL DE PROTEINAS DE VENENO DE SERPIENTE

Rachid C. Maroun, Unité de Bioinformatique Structurale, Institut Pasteur, 25, rue du Dr. Roux, 75724 Paris CEDEX France. Fax +33 1 45 68 87 19, [rmaroun@pasteur.fr](mailto:rmaroun@pasteur.fr)

*Palabras clave: venenos de serpiente, estructura 3D de proteínas, biomodelaje molecular.*

**Introducción.** La bioinformática es un dominio interdisciplinario surgido recientemente y que utiliza los conceptos y las técnicas de las matemáticas, de la física, de la ingeniería, de la biología, de la bioquímica, de la lingüística y de la informática o ciencia de la información para una mejor comprensión e utilización de las ciencias biológicas. La bioinformática es la investigación, desarrollo y aplicación de los métodos y útiles computacionales para extender los usos de los datos biológicos, médicos o de salud tal como los que provienen de los genomas de organismos. Estos útiles incluyen la adquisición, el almacenamiento, la organización, el archibajo, el análisis y la visualización de los datos.

La bioinformática estructural integra los métodos del biomodelaje molecular y se interesa a los métodos computacionales a fin de predecir y analizar la estructura espacial de proteínas, ácidos nucleicos y sus complejos a partir de la secuencia. Una de las metas es la producción, la manipulación y la representación de estructuras moleculares tridimensionales o de un sistema de partículas interactivas a fin de comprender las propiedades fisicoquímicas y biológicas desde un punto de vista molecular. Una variedad de métodos se utilizan tal como el análisis de secuencias, el alineamiento entre secuencias y estructuras tridimensionales (3D) así que la construcción de árboles filogenéticos. La predicción y clasificación de estructuras bidimensionales (2D), o sea estructura secundaria, de estructuras 3D y de la función de las moléculas permiten establecer las relaciones entre el espacio de secuencias, el de las estructuras y el de las funciones. Con esta metodología se han podido tratar una gran diversidad de familias de proteínas y así obtener modelos moleculares 3D con una gran grado de confianza.

Los venenos de serpiente son mezclas complejas de proteínas (varias centenas en un mismo veneno); cada proteína de esa mezcla posee una actividad biológica específica: toxina para matar a la presa, enzima hidrolítica para facilitar la digestión, proteína capaz de perturbar gravemente el metabolismo de la presa o del agresor. Los venenos de serpiente representan así una fuente excepcional de proteínas útiles para estudiar diversas funciones biológicas y/o como modelos moleculares que podrían utilizarse para aplicaciones prácticas. Los venenos de serpiente de las familias *Viperidae* y *Crotalidae* son ricos en proteínas que actúan sobre la hemostasis a nivel de blancos fisiológicos muy numerosos y diversos. En los organismos superiores existen varios mecanismos de defensa para evitar los efectos adversos de la pérdida de sangre o del bloqueo de su flujo. La hemostasis es el mecanismo principal en este proceso. La sangre se coagula para evitar su pérdida por herida a los vasos que la transportan. Muchas proteínas de veneno de serpiente que actúan a nivel de la hemostasis

presentan grandes similitudes estructurales, lo que permite clasificarlas en ciertas familias, aunque sus acciones fisiológicas sean muy diferentes. La gran especificidad de acción de esas proteínas, sus estabildades *in vitro* e *in vivo*, así que su resistencia a inhibidores endógenos han permitido su utilización en pruebas de diagnóstico y como utensilios farmacológicos en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. Los venenos de serpiente representan también una puerta de entrada al mundo de las toxinas.

El trabajo presentado aquí es una ilustración de la aplicación de la bioinformática estructural a una gran diversidad de familias de proteínas y enzimas que se encuentran en los venenos de serpiente. Entre estas familias de proteínas se encuentran las serina proteinazas, las pseudo-lectinas de tipo C y las fosfolipasas A2.

### Serina proteinazas

Las proteinazas a serina de veneno de serpiente pertenecen a la subfamilia de tipo tripsina. A diferencia de la tripsina, ellas son mucho más específicas y muestran un gran grado de identidad de secuencia entre ellas (60-66%). Sin embargo, sus sustratos fisiológicos son muy diferentes.

TSV-PA. El TSV-PA es una serina proteinaza de tipo activador de plasminógeno de la serpiente china *Trimeresurus stejnegeri*. Es una glicoproteína que activa muy selectivamente el plasminógeno humano en plasmina. El plasminógeno es el cimógeno responsable de la fibrinólisis. La activación es debida a una ruptura única de la molécula entre Arg561 y Val562. Esta ruptura de la ligadura amida es idéntica a esa de los activadores fisiológicos humanos de plasminógeno: la urocinasa y el t-PA, con los que presenta solo 21-23% de identidad de secuencia. Con el fin de localizar los determinantes esenciales de la especificidad de este tipo de serina proteinazas, e identificar los dominios funcionales, la biología molecular, la bioquímica y el biomodelaje molecular de la secuencia del TSV-PA fueron llevados a cabo.

Bothrombina y PA-BJ. El veneno de la serpiente sudamericana *Bothrops jararaca* contiene dos serina proteinazas, bothrombina y PA-BJ, que presentan 66% de identidad de secuencia entre ellas. Cada una de estas proteinazas posee una de las dos funciones procoagulantes esenciales de la trombina. La bothrombina coagula el fibrinógeno, mas no tiene un efecto directo sobre las plaquetas, mientras que la PA-BJ induce la agregación de plaquetas al interaccionar con el receptor PAR1 ("Protease-Activated Platelet Receptor) sin coagular el fibrinógeno. El objetivo es el de identificar los sitios de ligadura secundaria o exositos en la bothrombina y la PA-BJ equivalentes a los sitios correspondientes en la trombina, y así comprender la base molecular de la partición de las dos funciones

procoagulantes de la trombina entre las dos enzimas de veneno de serpiente en presencia de sus substratos naturales, el fibrinógeno y el PAR1, respectivamente.

#### Pseudo-lectinas de tipo C

Las proteínas de la familia de lectinas de tipo C animales que ligan y transportan carbohidratos tienen todas en común un motivo de 130 aminoácidos responsables de su actividad calcio-dependiente. Este motivo está caracterizado por 14 residuos invariantes y 18 muy conservados. Este motivo se llama el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Las proteínas más conocidas de esta familia son la proteína ligadora de la manosa (MBP) y la selectina E. Un gran número de proteínas de veneno de serpiente activas a nivel de la hemostasis han mostrado grandes homologías de secuencia con el CRD. Sin embargo, a pesar de esta homología, la mayor parte no posee los sitios funcionales para el reconocimiento del azúcar o del calcio. Es por eso que les llamamos pseudo-lectinas de tipo C. Al contrario de las lectinas clásicas, cuya especificidad está determinada principalmente por los monosacáridos simples, estas proteínas reconocen sus ligandos con un gran grado de selectividad. Estas son proteínas de una masa molecular alrededor de 30kDa, constituidas de dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente bisulfuro y poseyendo cada una un motivo estructural de tipo CRD. Las dos cadenas presentan no solamente una fuerte identidad de secuencia entre ellas, sino también con otras lectinas de tipo C de venenos de serpiente que tienen blancos fisiológicos diferentes. El estudio de la interacción específica de estas proteínas con su blanco podría permitir proponer nuevos anticoagulantes o antiplaquetarios.

**Bothrojaracina.** Hemos estudiado las relaciones entre estructura y función de la pseudo-lectina de tipo C del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Una de ellas es la bothrojaracina, un inhibidor potente y específico de la trombina. La bothrojaracina entra en competición con los ligandos macromoleculares de la trombina al formar un complejo equimolecular no covalente con ella. La trombina presenta dos grupos secundarios de ligadura a sus substratos macromoleculares. Estos exositos contienen residuos cargados positivamente, pero solo el primer sitio contiene además residuos aromáticos e hidrofóbicos. Los exositos están localizados en dos regiones diferentes de la molécula que no corresponden al sitio activo. La bothrojaracina es el único inhibidor de la trombina capaz de interactuar simultáneamente con los dos exositos sin afectar el sitio catalítico en el sentido estricto. Es así que este inhibidor es de un gran interés como modelo molecular para el desarrollo de nuevos agentes antitrombóticos.

#### Fosfolipasas A2

Las fosfolipasas A2 (PLA2) son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos en la posición sn-2, liberando ácidos grasos, incluyendo el ácido araquidónico (AA), un precursor de los eicosanoides bioactivos, y liberando también lisofosfolípidos. Otras

funciones de las PLA2 documentadas en la literatura incluyen la transducción de la señal, la defensa del anfitrión, la coagulación de la sangre y el remodelado de la membrana. En base a sus estructuras y características enzimáticas, las PLA2 han sido recientemente clasificadas en 10 grupos. Las PLA2 secretadas son pequeñas enzimas (~14kDa), bien organizadas (6-8 puentes bisulfuro) y que dependen del Ca<sup>2+</sup> (mM). El papel de las PLA2 secretadas de mamíferos y de venenos en el proceso de coagulación está bastante bien documentado. Existen PLA2 que actúan a un nivel presináptico, como las  $\beta$ -neurotoxinas, que bloquean la liberación de acetilcolina de las terminales nerviosas. En cuanto a la composición molecular o estructura cuaternaria, las PLA2 neurotóxicas pueden ser monoméricas o heterodiméricas. Se ha demostrado la existencia de PLA2s monoméricas en veneno de *Vipera ammodytes ammodytes*, como la ammodytoxina y sus isoformas A, B y C, que bloquean la liberación de la acetilcolina a nivel de la frontera neuromuscular.

**Crotoxina.** La crotoxina es una  $\beta$ -neurotoxina heterodimérica del veneno de una serpiente de cascabel sudamericana, la *Crotalus durissus terrificus*, que ejerce su acción letal a nivel presináptico al bloquear la transmisión neuromuscular. El complejo de la crotoxina se forma al asociarse de manera no covalente sus dos subunidades: la subunidad CA o crotapotina, compuesta de 3 cadenas polipeptídicas unidas por 7 puentes bisulfuro, desprovista de actividad enzimática, no tóxica, y la subunidad CB, una PLA2 básica, débilmente tóxica. La asociación de las dos subunidades resulta en un complejo de una toxicidad radicalmente aumentada, dando lugar a una sinergia fisiológica. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra la crotapotina neutraliza el poder letal de la crotoxina y del veneno. El mecanismo de esta neutralización es original, ya que el anticuerpo actúa disociando la crotoxina.

**Vaspina.** Tres serpientes venenosas son de una gran importancia en cuanto a la salud pública en Europa: *Vipera aspis*, *Vipera berus* y *Vipera ammodytes*. Los envenenamientos por *V. aspis aspis* y *V. berus berus*, las serpientes más extendidas en Francia, provocan en general síntomas locales asociados, en los casos más severos, a efectos sistémicos. Además, después de la mordida de *V. ammodytes* o *V. aspis zinnikeri*, se observan síntomas neurológicos. Las numerosas mordidas presentando signos neurológicos en el sudeste de Francia sugieren la aparición de una nueva población de serpientes. Un análisis a nivel genómico ha mostrado que ciertas enzimas son el objeto de un proceso de evolución molecular acelerada. Así, una nueva toxina heterodimérica proveniente del veneno de la serpiente *V. aspis aspis*, la vaspina, muy similar a la vipoxina de *V. ammodytes meridionalis* y a la PLA2-I de *V. aspis zinnikeri* ha sido clonada y la secuencia determinada. La vaspina es un complejo no covalente compuesto de una subunidad ácida y una PLA2 básica de grupo II.

**Metodología.** La estrategia utilizada en este trabajo es común a las diferentes familias de proteínas modeladas. Así intervienen:

- el análisis de las secuencias peptídicas blanco
- la búsqueda de proteínas homólogas o proteínas de referencia, a la proteína blanco y cuyas estructuras se conocen experimentalmente gracias a la cristalografía, a la RMN u a otra técnica
- la selección de un conjunto de estructuras de referencia
- el alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína blanco con las secuencias de las proteínas de referencia y la optimización de este alineamiento
- si la identidad de secuencia entre la proteína blanco y las proteínas de referencia es de 30% o más, proceder al modelaje de la proteína blanco utilizando el método de homología de secuencia
- si la identidad de secuencia es menor, recurrir a algoritmos del tipo “threading” o reconocimiento de repliegamientos
- si es necesario añadir substratos, cofactores u otros, obtener las estructuras de la base de datos estructurales o construirlos con las técnicas corrientes de grafismo molecular
- muestrear las conformaciones de las cadenas laterales (confórmeros) con el fin de mejorar el empaquetamiento de éstas, ya sea que las cadenas correspondan a residuos mutados o no y optar por las conformaciones con el menor número de encumbramientos estéricos y las mejores energías potenciales
- minimizar la energía interna de la molécula
- eventualmente proceder a una dinámica molecular con el objeto de encontrar mínimos de energía más profundos y explorar los movimientos internos de la proteína y sus amplitudes
- emprender la verificación de la calidad de la estructura. Esto concierne la precisión (estereoquímica, porcentaje de ocupación de regiones permitidas del mapa de Ramachandran) y la exactitud (errores de repliegamiento y scores generales de autocompatibilidad) de los modelos moleculares obtenidos.

En las diversas etapas generales de este protocolo se incluyeron la utilización de los programas ClustalW, insightII (Accelrys, San Diego, CA, USA; módulos Biopolymer, Homology, ProStat, DelPhi, Discover\_3). El campo de fuerza utilizado para los cálculos de energía interna y de dinámica molecular fue el CFF91. La superficie accesible al solvente de las proteínas se obtuvo con el módulo Surface de insightII.

## **Resultados y discusión.**

### Serina proteinazas.

TSV-PA. En el aspecto experimental, se centró la atención sobre 3 péptidos que muestran importantes diferencias de secuencia con otras proteinazas provenientes de veneno de serpiente. Por medio de la mutagénesis dirigida, estos péptidos fueron reemplazados por las secuencias correspondientes de la batroxobina, una enzima de la serpiente *Bothrops atrox* que coagula el fibrinógeno. El modelo obtenido (Fig. 1) permitió localizar los dominios variables y conservados y mostró que los 3 péptidos

mencionados se encuentran en la superficie de la molécula, de los cuales uno, cerca del sitio catalítico de la enzima, condujo a la desaparición del poder de activación del plasminógeno por el TSV-PA. En ausencia de estructura experimental, este modelo molecular permitió la comprensión de los resultados de los experimentos de mutagénesis dirigida. Este modelo fue posteriormente confirmado por la radiocristalografía, ya que la desviación estándar media entre las dos estructuras es de 1.0Å para 69% de la cadena principal. En la estructura experimental se observa que la entrada al sitio catalítico del TSV-PA está restringida debido a la presencia de varios lazos. (Referencias 1-4).

Bothrombina y PA-BJ. De manera análoga a la trombina, cada uno de los modelos que obtuvimos de las dos enzimas de veneno, en forma acomplejada con sus substratos naturales, presenta dos exositos. Sin embargo, los exositos contienen una proporción más pequeña de residuos básicos, comparadas con la trombina. Esto puede explicar la reducción de la diversidad funcional de estas enzimas con respecto a la trombina. Además, la composición del exosito I es diferente en ambas enzimas, lo que permite señalar los residuos que podrían estar implicados en las diferencias de especificidad. Finalmente, la alostería no aparece intervenir en el reconocimiento del sustrato macromolecular de estas enzimas, ya que no poseen los residuos claves utilizados por la trombina en este caso. (Fig. 2 y 3). (Referencias 5-9).

### Pseudo-lectinas de tipo C

Bothrojaracina. La secuencia de la bothrojaracina no presenta, como otros ligandos de la trombina, un reagrupamiento secuencial de cargas negativas. Hubimos obtenido un modelo molecular de la bothrojaracina basado en la estructura cristalográfica de la “Coagulation Factors IX/X Binding Protein”, proteína pariente de la bothrojaracina y que presenta fuertes homologías de secuencia y cuya dimerización procede por el mecanismo de intercambio de dominios. De nuestro modelo (Fig. 4) es evidente que existen dos sitios en la superficie de la molécula que reagrupan exclusivamente numerosos residuos ácidos. Estos “clusters” de residuos podrían estar implicados en la interacción bothrojaracina/trombina. Además, un sitio básico, completamente inesperado, ha sido detectado en la parte central del heterodímero. El modelo indica también que la disposición relativa de los dos sitios ácidos de la bothrojaracina no permite la interacción simultánea con los dos exositos básicos de una sola molécula de la trombina (Fig. 5). (Referencias 10-13).

### Fosfolipasas A2

Crotoxina. Hasta esta fecha no se dispone de la estructura experimental de la crotoxina. Según un modelo 3D de la subunidad CA que hubimos obtenido (Fig. 6), los aminoácidos que componen las dos secuencias consenso de unos péptidos seleccionados por la técnica de presentación de fagos están cerca en el espacio y constituyen una superficie muy expuesta al solvente. Las dimensiones y la composición del epítope cartografiado sobre CA están de

acuerdo con los datos disponibles sobre los sitios antigénicos de anticuerpos. Este trabajo dio lugar a una mejor comprensión de las relaciones entre estructura y función de la crotoxina y a la caracterización y localización de una parte del epítipo de CB sobre CA. (Referencias 14-19).

**Vaspina.** Obtuvimos un modelo 3D de esta nueva toxina (Fig. 7) en base a la estructura cristalográfica de la vipoxina. La vipoxina es una PLA2 heterodimérica y una neurotoxina postsináptica. Consiste en una proteína PLA2 básica neurotóxica a nivel presináptico, no tóxica, no enzimática, y una proteína ácida que la protege de la degradación y modifica su actividad farmacológica. La subunidad ácida de la vaspina presenta dos mutaciones con respecto a la subunidad ácida de la vipoxina, A35G y T70M. La subunidad básica presenta una mutación, K118R. El análisis estructural del modelo indica que la G35 no está expuesta al solvente y que no presenta encumbramientos estéricos. Así, ni la función ni la estructura del lazo que liga el  $Ca^{2+}$  no parecen ser perturbados. La sustitución T70M no modifica las cargas electrostáticas. La nueva cadena lateral de la M70 desplazaría 1-3 moléculas de agua interfaciales hacia la masa del solvente, provocando la pérdida de 1-2 puentes de hidrógeno. Este efecto entálpico desestabilizante podría ser compensado por un cambio positivo de la entropía que resultaría de la liberación de las moléculas de agua mencionadas. Dado este efecto de compensación entropía-entalpía, hemos predicho que la estabilidad del complejo de la vaspina era similar a la del complejo de la vipoxina. Ahora, la posición 118 de la subunidad básica está expuesta al solvente. Como en la estructura cristalográfica de la vipoxina, esta cadena lateral no está implicada en la interacción con la subunidad ácida. Por lo tanto no tiene efectos sobre la conformación de la PLA2 o del complejo. Además, esta sustitución no está situada en el interior de regiones implicadas en la neurotoxicidad de neurotoxinas postsinápticas como la vipoxina. Esta sustitución está también presente en la PLA2-I sin ninguna pérdida de neurotoxicidad. Una minimización de energía y una simulación de dinámica molecular de 10ns producen un complejo estable. En conclusión, las sustituciones observadas de aminoácidos no parecen tener efectos substanciales sobre la estabilidad del complejo no covalente y comportan diferencias estructurales limitadas. Este análisis sugiere que la toxina es activa y responsable de los síntomas neurológicos, tal vez actuando a nivel de la frontera neuromuscular. (Referencias 20-21).



Fig. 1. Superposición del modelo 3D del TSV-PA (azul) y de su estructura cristalográfica (verde), lo que resulta en una RMSD de 1.0Å para 69% de la cadena principal.

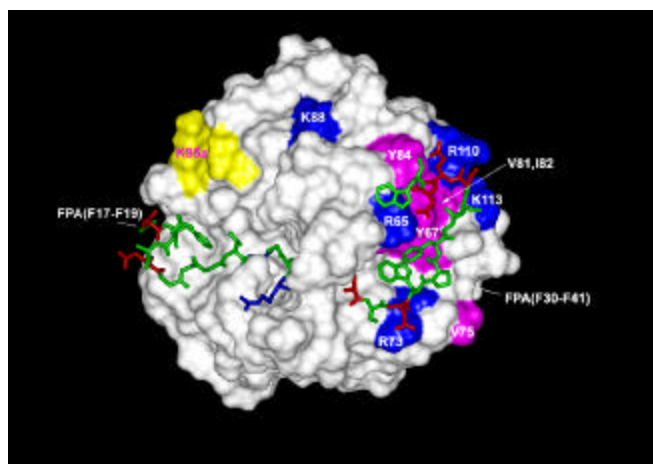


Fig. 2. Superficie accesible al solvente de la bothrombina (blanco) acomplejada al fragmento del Fg en hilo de hierro (verde). Bothrombina ESI, azul : residuos básicos ; rosa : residuos hidrofóbicos. ESI : amarillo: residuos básicos. Fibrinógeno, azul: básicos; rojo : ácidos ; el resto en verde.

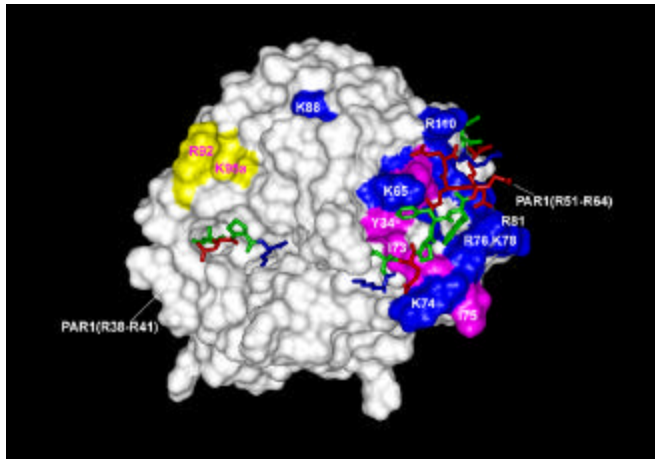


Fig. 3. Superficie accesible al solvente de la PA-BJ (blanco) acomplejada a los dos fragmentos del PAR1 en hilo de hierro (verde). PA-BJ, ESI, azul: residuos básicos; rosa: residuos hidrofóbicos. ESII: amarillo: residuos básicos. PAR1 azul: básicos; rojo: ácidos; el resto en verde.

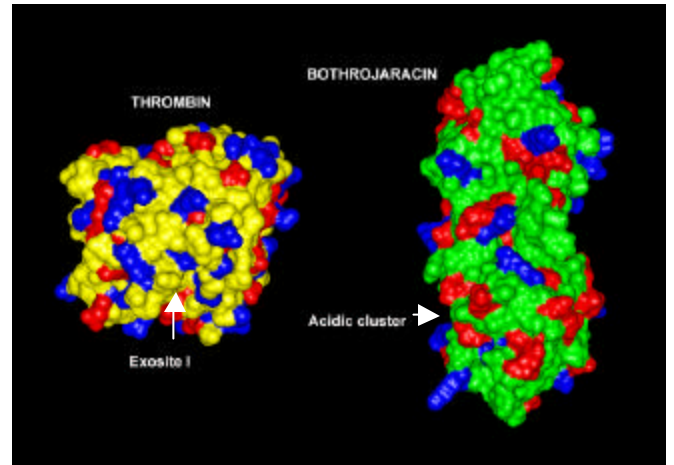


Fig. 5. Modelo del mecanismo de inhibición de la trombina por la bothrojaracina. Los exositos I y II de la estructura cristalográfica de la trombina presentan cada uno un grupo de residuos básicos. Dos regiones en el modelo de la bothrojaracina presentan grupos de residuos ácidos. Esta complementariedad electrostática representa posiblemente una forma de reconocimiento molecular.

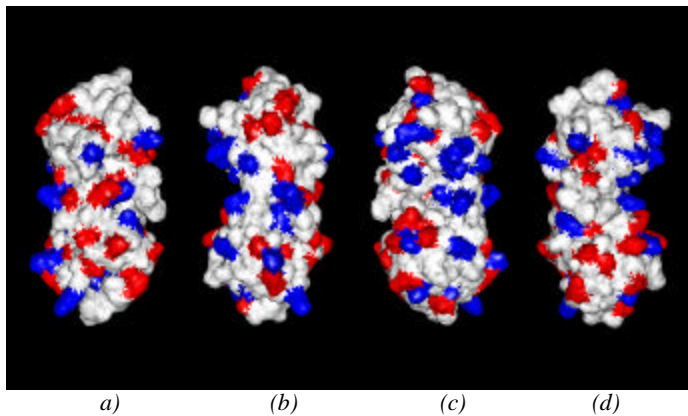


Fig. 4. La bothrojaracina no presenta, como otros ligandos de la trombina, grupos de residuos ácidos en su estructura primaria. El modelo obtenido pone en evidencia grupos ácidos en el espacio (rojo) en las extremidades del heterodímero ((a), abajo, (b), arriba), y un grupo de residuos básicos (azul) en su parte central (c). De izq. A der., rotación de  $+90^\circ$  alrededor del eje longitudinal de la molécula.

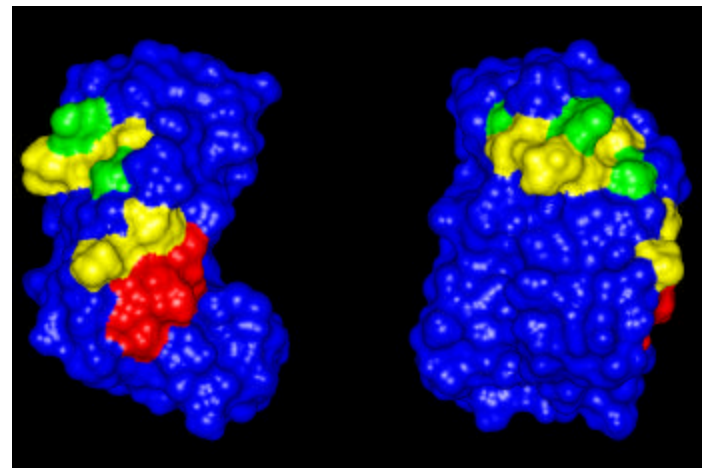


Fig. 6. Localización de una parte del epítipo discontinuo reconocido por un anticuerpo monoclonal sobre la superficie accesible al solvente de CA. La rotación de una vista con respecto a la otra es de  $90^\circ$  alrededor del eje vertical. Los residuos de la primera familia de péptidos están coloreados en verde (Y25, G26, A40) y amarillo (S23, S24, D39, S41, S109 et D111). Los residuos que pertenecen a la segunda familia están en rojo (K100, A103 e I104).



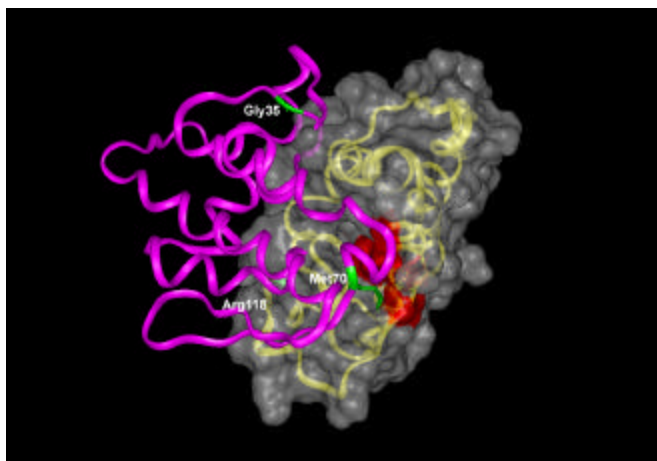


Fig.7. Un punto de la trayectoria dinámica de la vaspina, el heterodímero PLA2 neurotóxico no covalente. El modelo es derivado de la estructura del complejo de la vipoxina (PDB id: 1JLT). La subunidad ácida está en listón color magenta y la básica en amarilla. Los aminoácidos remplazados están en verde. La superficie accesible al solvente de los aminoácidos que forman la cavidad en frente de la Met70 está sombreada en rojo.

**Conclusiones.** La cuantificación, desde el punto de vista energético, de los cambios de secuencia y de estructura de proteínas y los efectos de esos cambios en la actividad han contribuido a comprender de una mejor manera la estabilidad termodinámica y los mecanismos y especificidades de acción y de reconocimiento molecular de las proteínas. Las metodologías que constituyen la bioinformática estructural (análisis de secuencias, alineamiento múltiple de éstas, biomodelaje y simulación moleculares) permiten hoy en día predecir, por ejemplo, los efectos de mutaciones sobre la actividad de una molécula y de sondear las regiones implicadas en el reconocimiento molecular o en la actividad catalítica. Claro es que, además de las aproximaciones inherentes a toda metodología, un número de situaciones no han todavía encontrado soluciones y representan los límites de esta disciplina. Como ejemplo tenemos el problema de la existencia de una gran cantidad de mínimos locales de la energía interna de la molécula en el hiperespacio conformacional. Esto rinde difícil la tarea del muestreo completo de este espacio y de la detección de mínimos reales de la energía. El tratamiento teórico correcto de la energía electrostática y de los efectos del solvente encuentra todavía dificultades. A pesar de esos límites, es claro hoy en día que la bioinformática estructural, en tanto que disciplina recientemente constituida, representa un verdadero medio de respuesta a toda una variedad de cuestión de naturaleza biológica que pueden surgir. Finalmente, es necesario decir que, a pesar de la convivialidad, facilidad de utilización y automatización de un número de programas disponibles en el presente, los problemas más difíciles no podrán ser resueltos en ausencia del conocimiento, de la experiencia y de la retrospectiva del investigador. Es así que sólo el discernimiento humano podrá distinguir los resultados que tienen un sentido físico y biológico de esos que no lo tienen.

**Agradecimiento.** Le agradezco al Dr. C. Bon y a la Unidad de Venenos del Instituto Pasteur de París sus participaciones de estos años a estos estudios. Estos trabajos fueron financiados por el Instituto Pasteur de París y por el INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Francia).

#### Bibliografía.

- 1) Zhang, Y., Wisner, A., Xiong, Y. & Bon, C. (1995). A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. *Journal of Biological Chemistry* 270, 10246-55.
- 2) Zhang, Y., Wisner, A., Maroun, R. C., Choumet, V., Xiong, Y. & Bon, C. (1997). Trimeresurus stejnegeri snake venom plasminogen activator. Site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry* 272(33), 20531-7.
- 3) Parry, M. A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C. & Bode, W. (1998). The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 6, 1195-206.
- 4) Braud, S., Parry, M. A., Maroun, R., Bon, C. & Wisner, A. (2000). The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. *Journal of Biological Chemistry* 275(3), 1823-8.
- 5) Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Ozaki, Y., Usami, Y., Suzuki, M., Titani, K., Yoshida, E., Sugimoto, M. & Yoshioka, A. (1994). Purification and characterization of bothrobin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of Bothrops jararaca. *Biochemistry* 33, 1843-9.
- 6) Serrano, S. M., Mentele, R., Sampaio, C. A. & Fink, E. (1995). Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of Bothrops jararaca. *Biochemistry* 34, 7186-93.
- 7) Guillin, M. C., Bezeaud, A., Bouton, M. C. & Jandrot-Perrus, M. (1995). Thrombin specificity. *Thrombosis & Haemostasis* 74, 129-33.
- 8) Maroun, R.C. (2002). Molecular Basis for the Partition of the Essential Functions of Thrombin among Snake Venom Serine Proteinases. The case of thrombin-like enzymes, *Haemostasis* 31, 247-256.
- 9) Maroun, R.C. & Serrano, S. (2003). Identification of the substrate-binding exosites of two snake venom serine proteinases; molecular basis for the partition of two essential functions of thrombin. *J. Mol. Recogn.* (en impresión).
- 10) Hirabayashi, J., Kusunoki, T. & Kasai, K. (1991). Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent-type lectins. *Journal of Biological Chemistry* 266, 2320-6.
- 11) Zingali, R. B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M. C. & Bon, C. (1993). Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32, 10794-802.
- 12) Arocas, V., Zingali, R. B., Guillin, M. C., Bon, C. & Jandrot-Perrus, M. (1996). Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry* 35, 9083-9.
- 13) Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 585-90.
- 14) Bon, C., Changeux, J. P., Jeng, T. W. & Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *European Journal of Biochemistry* 99, 471-81.
- 15) Kini, R. M. & Evans, H. J. (1989). Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry* 262, 14402-7.

- 16) Faure, G. & Bon, C. (1988). Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 27, 730-8.
- 17) Dennis, E. A. (1997). The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 1-2.
- 18) Choumet, V., Lafaye, P., Mazie, J. C. & Bon, C. (1998). A monoclonal antibody directed against the non-toxic subunit of a dimeric phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, neutralizes its toxicity. *Biological Chemistry* 379, 899-906.
- 19) Demangel, C., Maroun, R. C., Rouyre, S., Bon, C., Mazié, J. C. & Choumet, V. (2000). Combining phage display and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. *European Journal of Biochemistry* 267(8), 2345-53.
- 20) Ohno, M., Menez, R., Ogawa, T., Danse, J. M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin, S., Le Du, M. H., Boulain, J. C., Tamiya, T. & Menez, A. (1998). Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology* 59, 307-64.
- 21) V.Jan, R.C.Maroun, A.Robbe-Vincent, L.De Haro & V.Choumet (2002). «Toxicity Evolution of *Vipera Aspis Aspis* Venom: Identification and Molecular Modeling of a Novel Phospholipase A2 Heterodimeric Neurotoxin», *FEBS Letters* 527, 263-268.