



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

***RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA  
TRIDIMENSIONAL DO INIBIDOR  
TRÍPTICO E QUIMOTRÍPTICO DE  
VIGNA UNGUICULATA EM COMPLEXOS  
BINÁRIO E TERNÁRIO.***

Gisele Ferreira Esteves

2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

***RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA  
TRIDIMENSIONAL DO INIBIDOR  
TRÍPTICO E QUIMOTRÍPTICO DE  
VIGNA UNGUICULATA EM COMPLEXOS  
BINÁRIO E TERCIÁRIO.***

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia  
Celular do Instituto de  
Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília,  
como requisito parcial à  
obtenção do grau de doutor  
em Biologia Molecular.

Gisele Ferreira Esteves

Orientadora  
Prof<sup>fa</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia M. de Freitas

Co-orientador  
Prof. Dr. João Alexandre Barbosa Guimarães

2010

Aos meus pais, minha irmã  
e especialmente meu noivo.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a professora Dra. Sonia Maria de Freitas, por tudo. Nada disso teria sido possível se você não tivesse me aberto as portas do seu laboratório, da sua casa, da sua vida. Obrigada por todo o aprendizado e pelo seu exemplo de vida e pelos diversos conselhos nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Regina, pela sólida formação, pelo incentivo sempre carinhoso e pelo apoio durante todos os meus estudos. Essa vitória também é de vocês!

Ao meu noivo, Ademar, pela sua compreensão e abdicação do tempo que temos de convívio, em prol de realização deste trabalho, encorajando-me a prosseguir na execução desta tese. Sua presença foi a grande responsável pela minha saúde afetiva.

À minha irmã, Geisa, pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Ao prof. João Alexandre por toda a colaboração e pelo auxílio na minha estada no LNLS.

Aos professores Beatriz, Eliane, Jaime e Luciano pelos preciosos comentários e toda a colaboração nesta tese.

A todo o pessoal do laboratório, pela convivência, tanto nos momentos duros de trabalho como nos momentos de diversão. Aos companheiros que contribuíram de muitas formas: Adelson, Alice, Larissa, Muriele, Graziela, Cristiano, Sandrielle e Everton.

Aos meus amigos, que souberam entender os momentos em que eu tive de estar ausente: ao pessoal do anime, ao pessoal do japonês. Vocês são ótimos.

Aos meus colegas de trabalho: Beatriz, Hayslla, Rachel, Daniele, Marcus, Andre, Renato, Luciana. Obrigada pela força.

À Sandra e Ana, e ao Chiquinho, pela eficiência com que desempenham seu trabalho e por toda a ajuda.

E a todos os outros que não estão citados, mas não esquecidos, e que de alguma forma deram a sua contribuição para que esta tese fosse realizada.

Agradeço também a CAPES pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

O inibidor BTCl (Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor) foi isolado de *Vigna unguiculata*, purificado e cristalizado em complexos binário com  $\beta$ -tripsina e ternário com  $\beta$ -tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina em pH 4,5 e 7,5. Os dados cristalográficos foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). A estrutura cristalográfica da foi resolvida em 1,55 Å para o complexo binário com tripsina e 1,70 (pH 7,5) e 1,63 (pH 4,5) para o ternário, pelo método de substituição molecular utilizando a estrutura do inibidor de *Phaseolus angularis* (PDB 1tab) como modelo. O modelo final do complexo binário obtido após o refinamento foi depositado no PDB com o código 2G81, apresentando qualidade estrutural conforme indicado pelos valores de  $R_{\text{factor}}$  de 0,154 e  $R_{\text{free}}$  de 0,169 e os parâmetros estereoquímicos dentro da faixa de modelos de alta resolução estrutural. Similarmente o modelo do complexo ternário apresentou qualidade estrutural em pH 7,5 e 4,5 conforme indicado pelos valores baixos de  $R_{\text{factor}} = 0,171$  e  $0,168$ ;  $R_{\text{free}} = 0,218$  e  $0,192$  respectivamente. As estruturas tridimensionais desses complexos não apresentam diferenças significativas na estrutura tridimensional na cadeia principal. No entanto, modificações na estrutura tridimensional durante a formação dos complexos, principalmente nas cadeias laterais das enzimas, ocorrem. A estrutura cristalográfica do complexo binário com tripsina mostra que as mais importantes alterações conformacionais ocorrem na região da interface, indicadas pela alteração na acessibilidade dos resíduos de triptofil nessa região de contato. As interações observadas na região da tripsina são as mesmas em complexo binário e ternário. Em contraste, as análises de fluorescência dinâmica mostraram que a interação da quimotripsina com o BTCl não causa alteração na acessibilidade ao solvente dos triptofanos, e a interação da tripsina com o BTCl resulta no enterramento parcial de um grupo triptofil. Neste trabalho, o processo de desdobraimento dos complexos binários e ternário do BTCl foi realizado para analisar a estabilidade dessas moléculas. Estes ensaios foram acompanhados por dicroísmo circular utilizando temperatura como agente desnaturante. A associação do BTCl estabilizou a estrutura tridimensional das enzimas, indicado pelos maiores valores da temperatura de transição durante o desdobraimento e da energia livre ( $\Delta G$ ) após formação dos complexos.

## **ABSTRACT**

The inhibitor BTCI (Black-eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor) was purified from *Vigna unguiculata* seeds and crystallized in binary complex with  $\beta$ -trypsin and in ternary complex with  $\alpha$ -chymotrypsin and  $\beta$ -trypsin at pH 4.5 and 7.5. The crystallographic data were collected at the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS). The crystallographic structures were solved to a maximum resolution of 1.55 Å for the binary complex and 1.70 (pH 7.5) and 1.63 (pH 4.5) for the ternary complexes, by molecular replacement using the structure of the inhibitor from *Phaseolus angularis* (PDB code 1TAB) as a search model. The final model of the binary complex obtained after several refinement cycles was deposited in the protein data bank (PDB code 2G81). This model is of good quality as indicated by the low values of  $R_{\text{factor}} = 0.154$  and  $R_{\text{free}} = 0.169$  and stereochemical parameters within the range of high-resolution structural models. Similarly the ternary complex model showed structural quality at pH 7.5 ( $R_{\text{factor}} = 0.171$  and  $R_{\text{free}} = 0.218$ ) and pH 4.5 ( $R_{\text{factor}} = 0.168$  and  $R_{\text{free}} = 0.192$ ), respectively. The three-dimensional structures of these ternary complexes show no significant differences in their main chains. However, conformational changes were observed after complex formation, especially in the side chains of enzymes. The interactions of BTCI with trypsin are the same in binary and ternary complex. Most of the conformational changes of the binary complex with trypsin occur in the interface as indicated by the accessibility of triptofil residues in this contact region. In contrast, fluorescence analysis showed that the interaction of chymotrypsin with BTCI causes no change in solvent accessibility of tryptophans. In this work, the unfolding processes of binary and ternary complexes were performed by circular dichroism using temperature as denaturing agent to analyze the stability of these molecules. The association of BTCI stabilized the three-dimensional structure of the enzymes, indicated by the highest temperature transition and the unfolding free energy ( $\Delta G$ ) upon formation of complexes.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	- 4 -
RESUMO .....	- 6 -
ABSTRACT .....	- 7 -
SUMÁRIO .....	- 8 -
LISTA DE FIGURAS .....	- 10 -
LISTA DE TABELAS .....	- 14 -
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS .....	- 15 -
1.1 Proteases.....	17
1.1.1 Serinoproteases.....	18
1.2 Inibidores de proteases .....	23
1.2.1 Aspectos Gerais .....	23
1.2.2 Modo de ação dos inibidores .....	28
1.2.3 Família Bowman-Birk.....	30
1.2.4 Estrutura dos inibidores de protease.....	33
1.2.5 Importância dos inibidores de protease.....	35
1.3 Objeto de estudo.....	38
2 JUSTIFICATIVA.....	43
3 OBJETIVOS GERAIS .....	46
3.1 Objetivos específicos.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	47
4.1 Obtenção do extrato bruto de <i>Vigna unguiculata</i> .....	47
4.2 Purificação do btci .....	47
4.3 Obtenção e purificação dos complexos .....	47
4.4 Cristalização dos complexos .....	48
4.5 Coleta de dados .....	49
4.6 Construção do modelo.....	51
4.7 Refinamento do modelo.....	52
4.8 Análise do modelo .....	54
4.9 Espectroscopia de fluorescência dinâmica .....	55
4.10 Estabilidade térmica .....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
5.1 Purificação do BTCl.....	60
5.2 Purificação dos complexos binários.....	60
5.3 Coleta e processamento de dados da difração de raios-X do complexo binário com tripsina .....	63
5.4 Construção do modelo da estrutura tridimensional do complexo binário com tripsina .....	63
5.5 Análise do modelo da estrutura tridimensional do complexo binário com tripsina .....	66
5.6 Obtenção e purificação do complexo ternário.....	76
5.7 Coleta e processamento de dados da difração de raios X do complexo ternário.....	77
5.8 Construção do modelo da estrutura tridimensional do complexo ternário.....	78
5.9 Análise da região de interface da tripsina.....	86
5.10 Análise da região de interface da quimotripsina.....	93

5.11	Análise das diferenças na estrutura tridimensional observadas com a alteração do pH.....	98
5.12	Análise do tempo de vida de fluorescência.....	105
5.12.1	Complexo binário com a tripsina .....	109
5.12.2	Complexo binário com a quimotripsina .....	112
5.12.3	Complexo ternário.....	115
5.12.4	BTCI livre.....	119
5.13	Dicroísmo circular .....	124
7	CONCLUSÃO .....	134
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
9	ANEXOS.....	154

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura tridimensional da A) tripsina (PDB: 2ptc) e B) da quimotripsina (PDB: 4cha) os resíduos da tríade catalítica, Histidina 57, Aspartato 102 e Serina 195 estão destacados.

**Figura 2.** Representação das estruturas dos inibidores com *loops* canônicos e resíduos P1 destacados em vermelho. A estrutura secundária está colorida em azul (folhas- $\beta$ ) e verde ( $\alpha$ -hélice). Nome da família do inibidor em negrito e nome do representante indicado logo abaixo. Adaptado de (Krowarsch *et. al.*, 2003).

**Figura 3:** Estrutura tridimensional da superfície da tripsina (magenta) com o BBI na fenda. A seta vermelha indica o local de clivagem da ligação peptídica, a ligação dissulfeto que mantém o inibidor associado à enzima está em laranja (PDB: 1tx6).

**Figura 4.** Estrutura tridimensional de um inibidor da família bowman birk isolado de soja (PDB: 1bbi). Em magenta, os dois sítios reativos (P1, lisina e fenilalanina).

**Figura 5.** Cromatografia de troca iônica indicando a eluição do BTCI.

**Figura 6.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo binário com tripsina do BTCI. A seta indica a eluição do complexo. *Figura inserida:* Gel de poliacrilamida 12% desnaturante. Poço 1: complexo binário da  $\beta$ -tripsina (~24kDa) com o BTCI (10 kDa), Poço 2: Marcadores moleculares ( $M_m$ ), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de soja BBI (20kDa), mioglobina (14kDa).

**Figura 7.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo binário com quimotripsina do BTCI. A seta indica a eluição do complexo. *Figura inserida:* Gel de poliacrilamida 12% desnaturante. Poço 1: complexo binário da  $\alpha$ -quimotripsina (~25kDa) com o BTCI (10 kDa). As bandas acima da quimotripsina (banda mais forte) correspondem ao complexo e a agregados; Poço 2: Marcadores moleculares ( $M_m$ ), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (14kDa).

**Figura 8.** Alinhamento seqüencial do inibidor de *Phaseolus angularis* (PDB 1TAB cadeia I), com o BTCI (PDB 2G81, cadeia I).

**Figura 9.** Modelo da estrutura do complexo BTCI (verde) com a tripsina (magenta) incluindo as águas cristalográficas (vermelho) PDB: 2G81.

**Figura 10.** Potencial eletrostático da superfície da tripsina e do BTCI. **A)** Superfície da tripsina evidenciando a carga negativa do bolsão catalítico, representação em fitas (*ribbon*) da cadeia principal do BTCI em amarelo. **B)** Superfície do BTCI evidenciando a carga positiva da Lisina 26, representação em fitas (*ribbon*) da cadeia principal da tripsina em magenta.

**Figura 11.** Interação entre o BTCI (verde) Lys26 e a tripsina (magenta) Asp189 e Ser190 coordenado pelas moléculas de água W1

e W2. Os resíduos da tríade catalítica da enzima (His57, Asp102, Ser195) e o triptofano 215 estão evidenciados.

**Figura 12.** Interação entre o BTCI (verde) região P2 a P9 e a tripsina (magenta) mostrando algumas das pontes de hidrogênio (preto).

**Figura 13. A)** Região de interface do complexo BTCI-tripsina mostrando a superfície do triptofano 215 da tripsina (visão lateral em magenta) e o BTCI em verde. **B)** Superfície do triptofano 215 (visão lateral) da tripsina livre (magenta). **C)** Superfície do triptofano 215 (visão superior) da tripsina livre (magenta).

**Figura 14.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo ternário do BTCI em Sephadex G-75 de 75 cm, fluxo de 25 mL/h. A seta indica a eluição do complexo ternário.

**Figura 15.** Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante. Poço 1 e 4: marcadores moleculares ( $M_m$ ), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). Poço 2: complexo ternário do BTCI (~55 kDa).

**Figura 16.** BTCI (verde) em complexo ternário com a tripsina (rosa – bolsão em preto) e a quimotripsina (ciano – bolsão em cinza) em pH 7,5. Os sítios reativos do BTCI estão mostrados em laranja (tripsina) e amarelo (quimotripsina). Os resíduos P1 do BTCI estão destacados em azul (lisina 26) e vermelho (fenilalanina 52). Em oliva estão as ligações dissulfeto do inibidor.

**Figura 17.** Átomos do complexo ternário do BTCI (verde - traço) com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. O detalhe mostra a região entre as duas enzimas.

**Figura 18.** BTCI (verde- fitas- $\beta$  numeradas) em complexo com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. Em preto a distância entre a Lisina 26 (azul) e Fenilalanina 53 (laranja).

**Figura 19.** Interação entre o BTCI (verde) mostrando as cadeias laterais dos resíduos P1-P6 e P1' a P5' e a tripsina (magenta) no complexo ternário mostrando as várias ligações de hidrogênio (preto – tabela 8) com algumas águas (esfera vermelha). O sítio catalítico Histidina 57, Aspartato 102, Serina 195 está representado em cinza. Para melhor visualização outras regiões foram omitidas.

**Figura 20.** Mapa de densidade eletrônica da interface de interação entre a lisina 26 do BTCI (verde) com as águas W1 e W2 (esfera vermelha), o Aspartato 189 e Serina 190 da tripsina (rosa) no complexo ternário, sítio catalítico, Histidina 57, Aspartato 102, Serina 195 (cinza). Em amarelo uma ligação dissulfeto no BTCI. Para melhor visualização outras regiões foram omitidas.

**Figura 21.** Resíduos responsáveis pela interação do inibidor com a enzima - sobreposição da tripsina do complexo ternário (magenta) com a tripsina livre (laranja – 2PTN Walter *et. al.*, 1982).

**Figura 22.** Mapa de densidade eletrônica do BTCI (verde) em complexo ternário. Resíduo P1 Phe53 (laranja) na região de interação

com a quimotripsina (ciano) e em destaque estão os resíduos Trp171, Trp215, Val 225 (ciano) e a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195 (cinza).

**Figura 23.** Representação estrutural em superfície de van der Waals da interface do BTCI (verde) em complexo (ternário) com o resíduo P1 Phe53 (laranja) em destaque dentro do bolsão da quimotripsina (ciano). Os resíduos Trp171, Trp215, e Val225 (salmão) e His57, Asp102 e Ser195 (cinza) da quimotripsina são mostrados. A seta vermelha indica a região da cadeia do inibidor a ser hidrolisada. Para melhor visualização alguns trechos das moléculas foram omitidos.

**Figura 24.** Região de interface da quimotripsina (azul) com o BTCI (verde) em complexo ternário, com o resíduo P1 Phe53 (laranja) em destaque. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pretas tracejadas. As águas são exibidas como esferas. Para melhor visualização alguns trechos das moléculas foram omitidos, incluindo o sítio catalítico da enzima.

**Figura 25.** Resíduos da quimotripsina responsáveis pela interação com o inibidor - sobreposição da quimotripsina do complexo ternário (verde) com a quimotripsina livre (ciano – 4cha Tsukada e Blow, 1985).

**Figura 26.** Sobreposição da cadeia principal do BTCI em pH 7,5 (amarelo) e 4,5 (verde) mostrando os resíduos lisina 26 e fenilalanina 53.

**Figura 27.** Sobreposição da cadeia principal do BTCI em pH 7,5 (amarelo) e 4,5 (verde) mostrando as diferenças de conformação das cadeias laterais dos resíduos arginina 21 e 33 e fenilalanina 60.

**Figura 28.** Sobreposição da tripsina (magenta) em complexo em pH 7,5 (escuro) e 4,5 (claro) mostrando as diferenças na conformação das cadeias laterais dos aminoácidos. A cadeia principal está mostrada em traço e foi evidenciada apenas a superfície dos resíduos selecionados.

**Figura 29.** Sobreposição da quimotripsina (azul) em complexo em pH 7,5 (escuro) e 4,5 (claro) mostrando as diferenças nas cadeias laterais dos aminoácidos indicados. A cadeia principal está mostrada em traço e foi evidenciada apenas a superfície dos resíduos selecionados.

**Figura 30.** Gráfico da diferença de fase (círculo) e da modulação (quadrado) obtidas em relação à fase (verde) e modulação calculadas (azul) do modelo em função da frequência de modulação em MHz para o tempo de vida do complexo ternário. Abaixo estão representados os valores residuais após o ajuste para o modelo bimodal discreto.

**Figura 31.** Modelo do complexo binário do BTCI (verde) com a tripsina (magenta) com os triptofanos (laranja) em evidência. A seta indica a região de localização do triptofano do BTCI.

**Figura 32.** Representação da superfície molecular da tripsina e dos triptofanos (em laranja). Triptofanos expostos (A e B) e em interação com o solvente (C a E).

**Figura 33.** Representação da superfície molecular da tripsina e triptofanos (em laranja) evidenciando sua localização na superfície (A) e sua exposição e interação com o solvente (B).

**Figura 34.** Representação do complexo binário com o BTCI (verde) e a quimotripsina (ciano) com os triptofanos (51, 141, 172, 207, 215 e 237) da enzima coloridos em laranja, evidenciados na superfície da molécula (PDB de Freitas *et.al.*, 1997).

**Figura 35.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos coloridos em laranja, evidenciados na superfície da molécula ou parcialmente enterrados.

**Figura 36.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos da tripsina coloridos em laranja, evidenciando sua exposição ao solvente.

**Figura 37.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos da quimotripsina coloridos em laranja, evidenciando sua exposição ao solvente.

**Figura 38.** Superfície molecular dos oligômeros formados pelo BTCI em dímero (A), trímero (B) e hexâmero (C, D) com a região do triptofano colorida em laranja, evidenciando sua localização na superfície da molécula (Modelos de Silva *et. al.*, 2005).

**Figura 39.** Curvas de desnaturação térmica das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCI em complexo binário com quimotripsina, com tripsina e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

**Figura 40.** Fração desnaturada termicamente das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCI em complexo binário com quimotripsina, com tripsina e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

**Figura 41.** Variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) estimada a partir das curvas de desnaturação térmica das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCI em complexos binário com quimotripsina, tripsina, e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

**Figura 42.** Gráfico de Van't Hoff para a desnaturação térmica da tripsina, da quimotripsina e para o BTCI em complexos binário com quimotripsina, tripsina, complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Coleta de dados do complexo BTCl - Tripsina e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,63 – 1,55° Å.

**Tabela 2.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCl em complexo com a Tripsina.

**Tabela 3.** Contatos polares entre o BTCl, a tripsina e águas selecionadas.

**Tabela 4.** Coleta de dados do complexo ternário em pH 7,5 e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,96 – 1,7° Å.

**Tabela 5.** Coleta de dados do complexo ternário em pH 4,5 e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,69 – 1,63° Å.

**Tabela 6.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCl em complexo ternário em pH 7,5 .

**Tabela 7.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCl em complexo ternário em pH 4,5.

**Tabela 8.** Contatos polares entre o BTCl, a tripsina e águas selecionadas no complexo ternário.

**Tabela 9.** Contatos polares entre o BTCl, a quimotripsina e águas selecionadas no complexo ternário.

**Tabela 10.** Resíduos da tripsina que apresentam diferenças entre o pH 4,5 e 7,5.

**Tabela 11.** Resíduos da quimotripsina que apresentam diferenças entre o pH 4,5 e 7,5.

**Tabela 12.** Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência do BTCl em complexo ternário.

**Tabela 13.** Dados obtidos dos valores ajustados de fluorescência dinâmica para o BTCl e seus complexos.

**Tabela 14.** Parâmetros termodinâmicos dos complexos com o BTCl calculados a partir das curvas de desnaturação térmica em tampão 2 mM HEPES pH 7,0.

## **LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS**

$\Delta G^{25}$  Variação da energia livre de Gibbs a 25°C

$\Delta H$  Variação de entalpia

$\Delta S$  Variação de entropia

BTCl "*Black eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor*"

DC Dicroísmo Circular

Fu Fração desnaturada da proteína

LNLS Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

MPD 2-metil 2,4-pentanodiol

PDB "*Protein data bank*"

PEG Polietilenoglicol

RMSD "*Root mean square deviation*"

T<sub>m</sub> Temperatura média de desnaturação

### Abreviações de Resíduos de aminoácidos 3 LETRAS – 1 LETRA

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

“Não existe um caminho para a felicidade.

A felicidade é o caminho.”

Mahatma Gandhi.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Proteases

Proteases compreendem um grande grupo de enzimas proteolíticas envolvidas em vários tipos de eventos fisiológicos. Essas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas presentes em substratos protéicos ou peptídicos; podendo também ser chamadas peptidases. Esta clivagem resulta em ativação, inativação funcional, proteólise limitada ou na digestão da molécula em questão. As enzimas proteolíticas estão presentes em vários tecidos de animais, plantas e microorganismos (Macedo *et.al.*, 2000).

Atualmente as proteases são classificadas em seis famílias: serino, treonina, cisteíno, aspártico, metaloproteases e proteases de ácido glutâmico (Cai *et.al.*, 2005). A classificação é baseada em sua função, especificidade, estrutura tridimensional, comparação dos sítios ativos e mecanismo catalítico (Grzonka *et.al.*, 2001; Powers *et.al.*, 2002).

As cisteinoproteases, presentes em todos os organismos vivos, possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo (Barret e Rawlings, 2001). Dentre elas pode se destacar a família da papaína por ser a mais bem estudada. A papaína é caracterizada por uma estrutura de dois domínios com o sítio ativo situado entre esses domínios. Os resíduos catalíticos cisteína 25 e a histidina 159 são evolutivamente preservados em todas as cisteinoproteases (Grzonka *et.al.*, 2001).

As asparticoproteases apresentam resíduos de aspartato no sítio ativo e são enzimas cujo pH ótimo se encontra na faixa ácida, como exemplo a pepsina (Cooper, 2002).

As metaloproteases se caracterizam pela necessidade de um íon metálico para a sua atividade, sendo que a maioria delas é dependente de  $Zn^{2+}$ , mas há também há as que dependem de  $Mn^{2+}$

ou como, a colagenase que requer a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (DeClerk, 2000). Treonino proteases são proteases que apresentam treonina no sítio ativo e são responsáveis pelo funcionamento do proteassoma. Essa classe foi incluída apenas a partir de 1995 (Hooper, 2002). As glutâmico proteases foram descritas recentemente e apresentam apenas uma família, cuja atividade catalítica parece iniciar-se com a ativação do resíduo de ácido aspártico. Essas enzimas têm sido descritas somente em fungos (Sims *et.al.*, 2004).

As serinoproteases representam o grupo das enzimas proteolíticas mais bem estudado e caracterizado e apresentam um resíduo de serina, histidina e ácido aspártico no sítio ativo (Hedstrom, 2002; Gettins, 2002). Essas enzimas são divididas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C-terminal e as exopeptidases atuam somente nas regiões N ou C terminal. Cada família tem uma característica comum de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados numa configuração específica, formando o sítio ativo (Koiwa *et.al.*, 1997; Powers *et.al.*, 2002).

### **1.1.1 Serinoproteases**

As serinoproteases são as enzimas proteolíticas mais estudadas e melhor caracterizadas bioquimicamente. Elas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos tais como: digestão, desenvolvimento, processos inflamatórios, proliferação celular, diferenciação, permeabilidade vascular, reabsorção óssea e coagulação (Powers *et.al.*, 2002).

As serinoproteases são amplamente distribuídas na natureza, em duas principais famílias representadas pela subtilisina e pela tripsina (Kraut, 1977), ambas apresentando estruturas tridimensionais diferentes, todavia com a mesma geometria do sítio ativo. As enzimas da família subtilisina são encontradas apenas em bactérias, enquanto as da tripsina são encontradas tanto em procariontes quanto em microorganismos eucariontes, plantas e animais (invertebrados e vertebrados), compreendendo enzimas como a quimotripsina, tripsina, elastase e calicreína (Coombs *et. al.*, 1999; Hartley, 1970).

As proteases serínicas em geral apresentam um sítio ativo circundado por duas alças flexíveis em forma de um bolsão que permite o acesso de substratos ou inibidores com formas complementares. Além da complementaridade de forma, a interação de substratos e inibidores com a enzima ocorre por atração eletrostática e/ou hidrofóbica. O sítio ativo das serinoproteases é formado pelos resíduos de aspartato, serina e histidina, conhecidos como tríade catalítica e estão envolvidos diretamente com a hidrólise das ligações peptídicas (Bode e Huber, 1992). Os aminoácidos que formam a ligação peptídica a ser hidrolisada por essas enzimas são designados como  $P_1$ - $P_1'$ . Os outros resíduos, que interagem com a enzima na região de especificidade são denominados como  $P_4$ - $P_2$  (região N-terminal) e como  $P_2'$ - $P_4'$  (região C-terminal) (Schechter e Berger, 1967).

Dentre as enzimas que constituem as serinoproteases da família da tripsina, três delas são destacadas: a tripsina, que cliva substratos com resíduos de aminoácidos carregados positivamente;  $\alpha$ -quimotripsina, que clivam substrato com resíduos aromáticos ou cadeias laterais alifáticas grandes; e elastase, que cliva substratos com cadeias laterais alifáticas pequenas (Kraut, 1977; Steiz e Schulman, 1982).

### 1.1.1.1 Tripsina

A tripsina (3.4.21.4) é uma serinoprotease do tipo endopeptidase encontrada no aparelho digestivo, onde cliva proteínas. É formada por uma cadeia de 223 resíduos de aminoácidos e contém seis ligações dissulfeto. É uma proteína globular com uma predominância de folhas  $\beta$  antiparalelas e hélices na sua estrutura secundária e tem dois domínios iguais. A  $\beta$ -tripsina tem uma única cadeia de polipeptídios, enquanto  $\alpha$ -tripsina tem duas cadeias resultantes de uma clivagem autocatalítica. As duas enzimas apresentam diferentes características cinéticas em suas reações com alguns substratos sintéticos (Hruska *et.al.*, 1969).

A tripsina predominantemente cliva cadeias peptídicas no lado carboxila dos aminoácidos lisina e arginina, exceto quando são seguidos por prolina (Keildlou *et.al.*, 1971). O resíduo aspartato (Asp 189) localizado no "bolsão" catalítico (S1) da tripsina é responsável pela captação e estabilização da lisina carregada positivamente e / ou arginina, e é assim responsável pela especificidade da enzima.

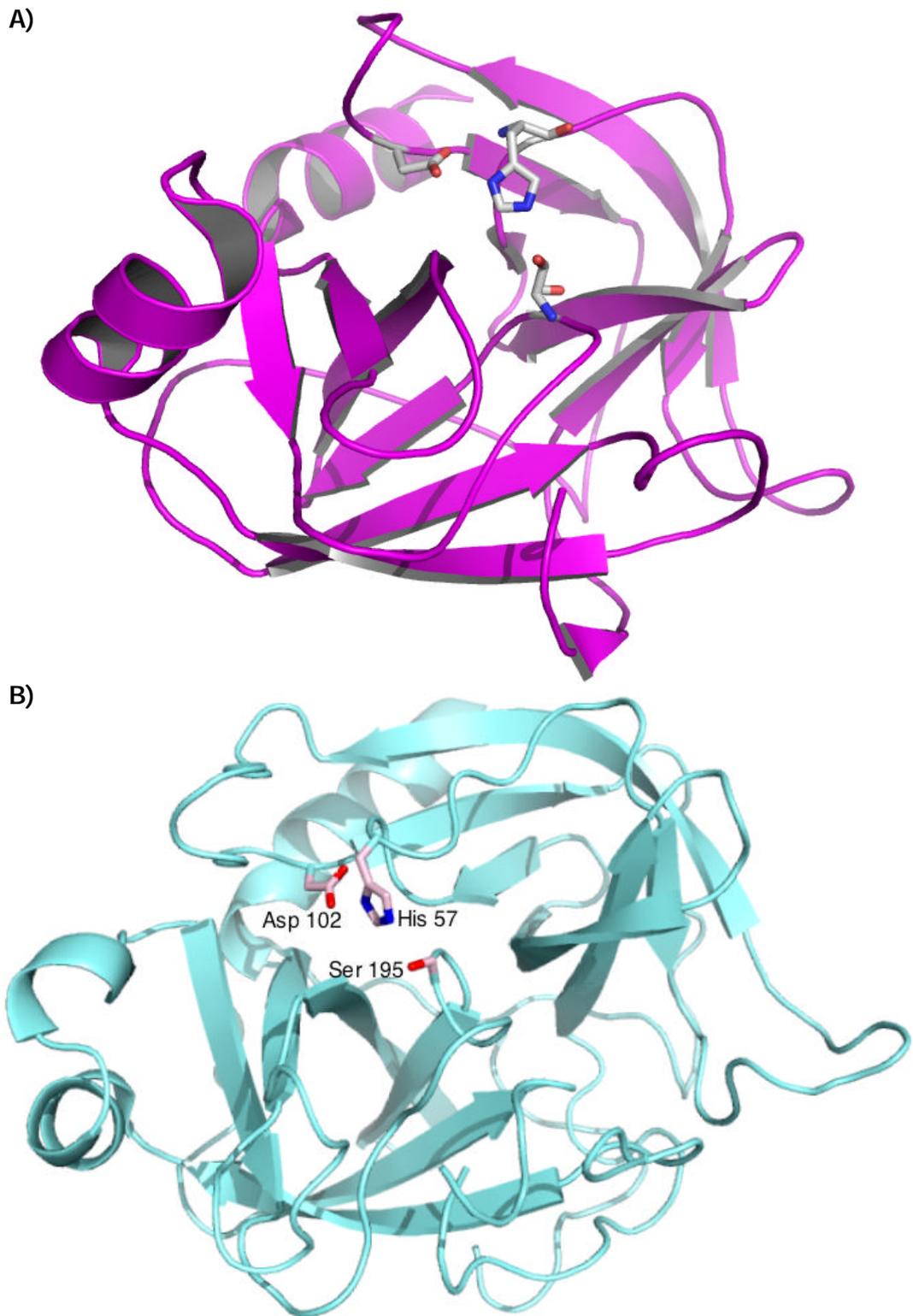
O mecanismo enzimático é semelhante a todas as outras serinoproteases: a tríade catalítica possibilita a formação da serina nucleofílica por modificação do seu ambiente eletrostático. A serina é ativada por uma histidina e um aspartato que removem o átomo de hidrogênio da serina, tornando-a mais reativa quando ataca a cadeia principal da proteína alvo, na presença de uma molécula de água. A tripsina apresenta um pH ótimo de 8 e temperatura ideal de aproximadamente 37°C (Keildlou *et.al.*, 1971).

### 1.1.1.2 Quimotripsina

A quimotripsina (3.4.21.1) é uma serinoprotease do tipo endopeptidase encontrada no aparelho digestivo de vertebrados, onde atua principalmente na clivagem de proteínas. A quimotripsina predominantemente cliva cadeias peptídicas no lado carboxila dos aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano, fenilalanina que encaixam em um bolso hidrofóbico na enzima.

O mecanismo enzimático é semelhante a todas as outras serinoproteases: a tríade catalítica favorece a forma nucleofílica da serina. A hidrólise ocorre em duas etapas. Primeiro ocorre acilação do substrato para formar um intermediário acil-enzima, e, em seguida, uma deacilação a fim de devolver a enzima a seu estado original. Isto é conseguido por meio da modificação do ambiente eletrostático da serina 195 que brevemente se liga covalentemente ao substrato, formando um intermediário, enzima-substrato.

Essa enzima apresenta dois domínios, cada um deles contendo cerca de 120 aminoácidos. Os dois domínios são do tipo barril- $\beta$ , consistindo de seis fitas  $\beta$ -antiparalelas que apresentam a mesma topologia: um motivo de "chave grega" seguido por um motivo de "grampo antiparalelo" (Branden e Tooze, 1991).



**Figura 1.** Estrutura tridimensional da A) tripsina (PDB: 2ptc) e B) da quimotripsina (PDB: 4cha) os resíduos da tríade catalítica, Histidina 57, Aspartato 102 e Serina 195 estão destacados.

Uma proteólise descontrolada, desregulada e indesejada pode conduzir a muitos estados de enfermidade, incluindo enfisema, derrame cerebral, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite (Powers *et.al.*, 2002). Para limitar esses potenciais danos, tais moléculas devem ser estritamente controladas.

O controle da atividade proteolítica ocorre pela biosíntese destas enzimas sob a forma de precursores inativos, denominados zimogênios, cuja ativação dependerá de uma proteólise ou remoção de aminoácidos na porção N-terminal da molécula precursora; pela regulação da expressão/secreção; pelo bloqueio total ou diminuição da atividade catalítica sobre um determinado substrato por meio de moléculas denominadas inibidores, que foram um complexo estequiométrico com a protease (Powers *et.al.*, 2002).

## **1.2 Inibidores de proteases**

### **1.2.1 Aspectos Gerais**

Embora as serinoproteases possam realizar várias funções essenciais à vida suas atividades precisam ser controladas. Este pode ser o motivo pela qual a atividade dessas proteases não só é controlada pela ativação proteolítica de suas formas inativas, por sua auto-inativação (autólise), assim como por sua inibição com inibidores de protease específicos (Mosolov *et. al.*, 2001). Inibidores de proteases coexistem com suas proteases alvo por meio de um processo altamente regulado - limitando a proteólise do substrato às suas enzimas cognatas (Karban e Baldin, 1997).

Inibidores de proteases são encontrados em microorganismos, plantas e animais e desempenham várias funções importantes. São geralmente considerados como sendo reguladores endógenos de proteases, proteínas de armazenamento e, de defesa na planta

contra ataques de predadores e infecção por microrganismos (Haq *et.al.*, 2004). Estes inibidores têm sido estudados particularmente em plantas das famílias *Leguminosae*, *Gramineae* e *Solanaceae* (Konarev *et.al.*, 2002). Inibidores aparecem como constituintes protéicos em diferentes fases da vida vegetal, sendo que é na semente onde aparecem os mais elevados níveis dessa molécula, que é essencial para a germinação (Shewry, 1995; Shewry e Lucas, 1997) e para o controle e desenvolvimento do embrião (Tang *et.al.*, 1993).

Em sementes de *Gramineae* e *Leguminosae* têm sido relatadas altas concentrações de inibidores de protease (Richardson, 1977). Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (Brandon e Friedman, 2002), sendo que cerca de 20% da inibição da atividade triptica nos grãos é causada pela ação do Inibidor da família Bowman Birk – BBI (Brandon e Bates, 1989). Em folhas, os níveis de inibidores são normalmente baixos podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas sofrem danos mecânicos, ou são expostas a alguns tipos de fitohormônios como o ácido jasmônico aumentando a expressão dos genes do inibidor (Rakwal *et.al.*, 2001).

Além da síntese de inibidores de proteases induzida no local do ataque, foi demonstrado que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema e estimulam a síntese desses inibidores por toda a planta (Jongsma e Bolter, 1997), se expressando em folhas e caules submetidos à injúria (McGurl *et.al.*, 1995; Rakwal *et.al.*, 2001; Rohrmeier e Lehle, 1993).

Em vertebrados, os inibidores atuam na homeostase corporal regulando as proteases no sistema imune, na cascata de coagulação sanguínea, na matriz extracelular, digestão, embriogênese e sistema nervoso. As proteases inibidas normalmente estão relacionadas a vários diferentes processos. Dentre eles podemos citar a degradação de tecidos, a regulação de morte celular programada e a proliferação

celular. Em invertebrados, agem em processos fisiológicos fundamentais de maneira similar aos vertebrados: na cascata de regulação da coagulação e resposta imune inata.

Inibidores naturais são classificados em 18 diferentes famílias. Não há consenso entre os autores quanto a melhor nomenclatura, mas quase todos os autores preferem agrupá-los de acordo com as proteases alvo. As diversas classes de inibidores de proteases são subdivididas em várias famílias baseando-se na extensiva homologia da estrutura primária entre seus membros, nas relações topológicas entre as ligações dissulfeto, na localização do sítio reativo (Laskowski e Kato, 1980; Laskowski e Qasim, 2000), nos mecanismos de ação e na estrutura tridimensional destas proteases (Jongsma e Bolter, 1997).

Além disso, apesar de existirem classes de inibidores com diferentes dobramentos, todos parecem partilhar um formato de alça de mesma conformação tanto em forma livre quanto em complexos com as proteases, o que é o principal determinante da inibição (Bode e Huber, 1992). Dentre estes os mais estudados são os inibidores de serinoproteases do tipo Bowman-Birk e do tipo Kunitz (Ascenzi *et. al.*, 2003).

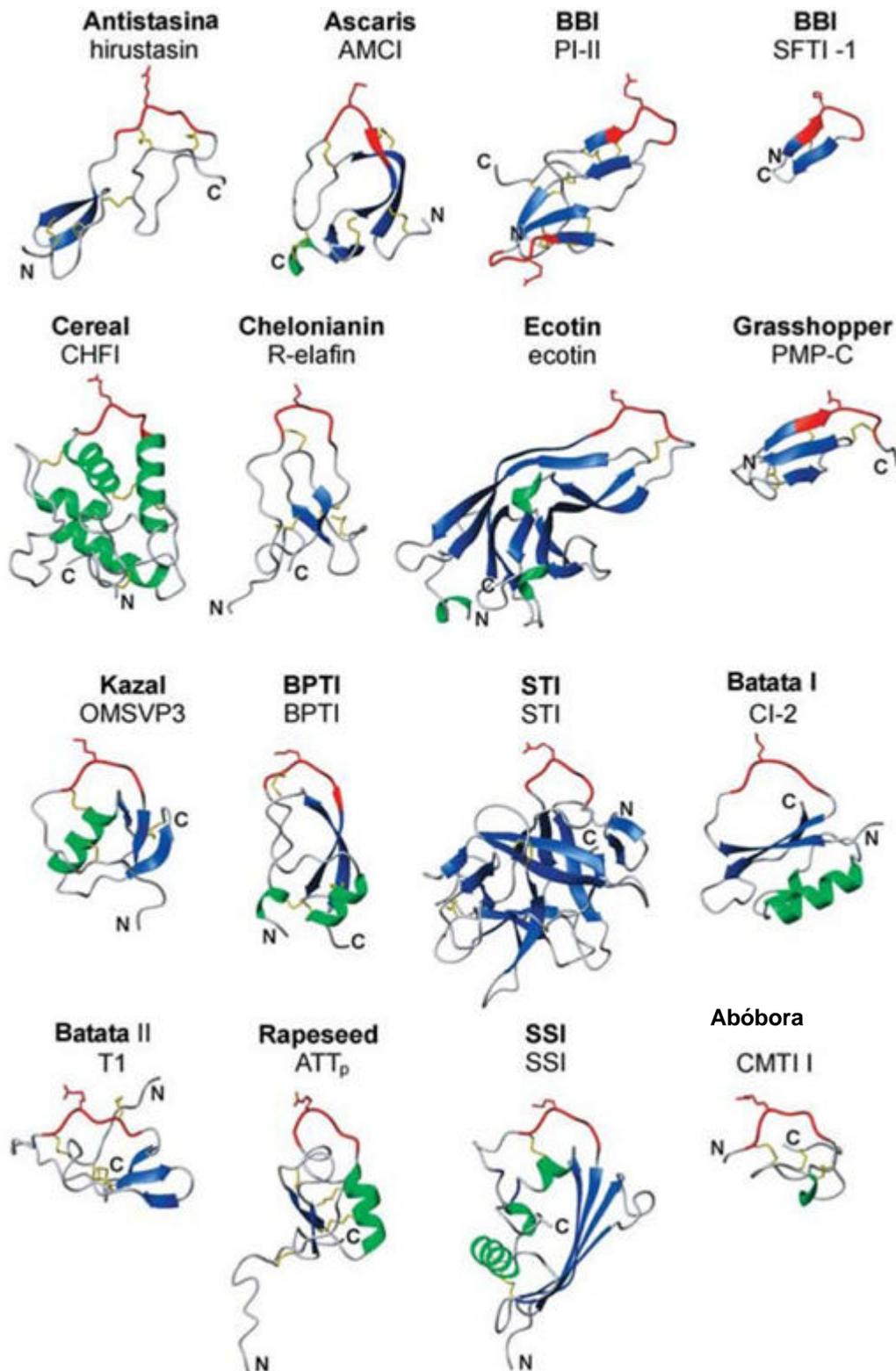
As estruturas gerais de proteínas que representam as diversas famílias de inibidores são completamente diferentes. Na maioria das vezes eles compreendem somente folha  $\beta$  ou proteínas tipo  $\alpha/\beta$ : que também podem ser proteínas com  $\alpha$ -hélices ou proteínas irregulares ricas em ligações dissulfeto (Krowarsch *et. al.*, 2003) com 9 a 21 kDa por domínio.

Mas o segmento responsável pela inibição da protease surpreendentemente tem sempre uma conformação semelhante em todas as estruturas canônicas de inibidores conhecidos (Bode e Huber, 1992; Schechter e Berger, 1967). Nesse caso o segmento de

ligação é composto de poucos resíduos (em torno de 9) e mantido em uma conformação pouco flexível.

Os inibidores com estruturas canônicas representam o exemplo singular e extenso de evolução convergente de proteínas, uma vez que uma função biológica semelhante foi implementada várias vezes durante a evolução por meio da preservação da conformação do *loop* canônico em muitas proteínas independentes (Laskowski e Qasim, 2000). Exemplos de dobramentos diferentes de estruturas de inibidor de diferentes famílias são mostrados na figura 2.

As famílias que estão representadas na figura 2, e que são normalmente encontradas em plantas são: Abóbora e Batata tipos I e II, Bowman Birk (BBI), Kunitz tipo STI e Rapeseed. As famílias encontradas em animais são: Antistatina, Ascaris, Chelonianian, Grasshopper, Kazal e Kunitz tipo BPTI. A família Ecotin ocorre somente em microorganismos.



**Figura 2.** Representação das estruturas dos inibidores com *loops* canônicos e resíduos P1 destacados em vermelho. A estrutura secundária está colorida em azul (folhas- $\beta$ ) e verde ( $\alpha$ -hélice). Nome da família do inibidor em negrito e nome do representante indicado logo abaixo. Adaptado de (Krowarsch *et. al.*, 2003).

### 1.2.2 Modo de ação dos inibidores

O modo de ação dos inibidores de protease consiste em formar complexos com as enzimas proteolíticas resultando em sua inativação (Mosolov *et. al.*, 2001). A inibição de uma enzima proteolítica é competitiva e ocorre pela ligação do sítio ativo da enzima à região reativa do inibidor (sítio reativo), exposto e mantido em uma conformação similar àquela do substrato das enzimas alvo (Laskowski e Qasim, 2000).

Os inibidores reagem num complexo estequiométrico 1:1. A equação do mecanismo clássico, sugerida por Laskowski e Kato (1980)

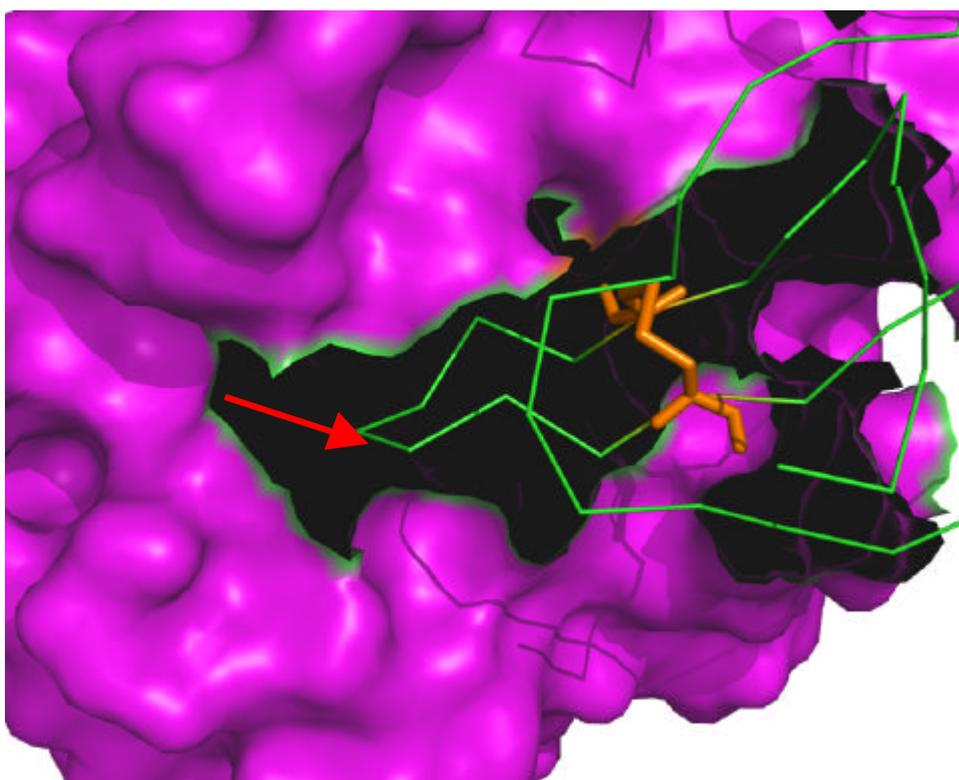


E e I são respectivamente a enzima e o inibidor, I\* é o inibidor modificado, C é o complexo estável. Essa equação se refere a inibidores com o mecanismo clássico, isto é, inibição reversível, em que a concentração da enzima é muito pequena em relação à concentração do inibidor e do substrato, e o equilíbrio entre a enzima e o inibidor é rapidamente alcançado.

A inibição decorre da não ligação do substrato à enzima devido ao impedimento estereoquímico provocado pela ligação do inibidor à enzima (Bode e Huber, 1992; Laskowski e Kato, 1980; Bieth, 1995; GarciaCarreno, 1996). Essa ligação ocorre de modo semelhante ao da ligação do substrato, formando complexos estáveis do inibidor com as proteases alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima (Laskowski e Kato, 1980; Haq *et. al.*, 2004).

A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado. Os inibidores são lentamente hidrolisados (Jensen et

al 1996), uma vez que a enzima reage com a molécula do inibidor como se ele fosse um substrato. Entretanto, o produto formado é o inibidor com uma ligação peptídica clivada, mas permanentemente ligado ao bolsão catalítico devido à presença de uma ligação dissulfeto que envolve o sítio reativo no *loop* canônico, não ocorrendo a dissociação do inibidor já clivado pela enzima (figura 3).



**Figura 3.** Estrutura tridimensional da superfície da tripsina (magenta) com o BBI na fenda. A seta vermelha indica o local de clivagem da ligação peptídica, a ligação dissulfeto que mantém o inibidor associado à enzima está em laranja (PDB: 1tx6).

Inibidores segundo este mecanismo são altamente específicos com a proteólise limitada a substratos para nas enzimas alvo. Na superfície de cada molécula de inibidor está localizado o sítio reativo, que especificamente interage com o sítio ativo da enzima. Em

concentrações normalmente utilizadas e em pH neutro a hidrólise dos inibidores é extremamente lenta, e o sistema se comporta como se fosse um simples equilíbrio entre, de um lado, o inibidor e a enzima livres, e do outro, o complexo (Laskowski e Kato, 1980). A ligação peptídica hidrolisada especificamente no inibidor é a do resíduo P1 do sítio reativo. Em todos os inibidores que obedecem ao mecanismo padrão, o sítio reativo que contém a ligação peptídica está englobado em pelo menos um loop definido por uma ligação dissulfeto, que assegura que durante a conversão do inibidor virgem ao inibidor clivado, as duas cadeias peptídicas do inibidor não podem se dissociar, mantendo o inibidor associado à enzima (Laskowski e Kato, 1980).

### **1.2.3 Família Bowman-Birk**

Os Inibidores Bowman-Birk foram isolados e caracterizados inicialmente em sementes de soja (Bowman, 1946; Birk *et.al.*, 1963). Este tipo de inibidor é amplamente distribuído em sementes de leguminosas (Norioka e Ikenaka, 1983) e de gramíneas (Odani *et.al.*, 1986), em cereais, e também encontrados em folhas e caules danificados (McGurl *et.al.*, 1995; Rakwal *et.al.*, 2001; Rohrmeier e Lehle, 1993).

Outras seqüências de aminoácidos similares a esta família têm sido encontradas em inibidores isolados de outras leguminosas, como de amendoim *Arachis hypogaea* (Norioka e Ikenaka, 1983), feijão azuki - *Vigna angularis* (Shikawa *et.al.*, 1985) e feijão de corda - *Vigna unguiculata* (Morhy e Ventura, 1987).

O nome dessa família de inibidores faz referência aos primeiros pesquisadores a isolarem e caracterizarem um de seus membros: BOWMAN (Bowman, 1946) e BIRK (Birk *et.al.*, 1963). O inibidor

Bowman-Birk isolado da soja – BBI é o mais estudado membro dessa família, referenciado como “BBI clássico”. O significado fisiológico dos BBI foi associado a três principais funções: regulação de proteínas endógenas, reserva de aminoácidos sulfurados (Richardson, 1977) e defesa contra o ataque de patógenos e insetos. No último caso, os BBI parecem atuar inibindo a atividade proteolítica das enzimas digestivas desses organismos, interferindo tanto em seu desenvolvimento como na reprodução (Pompermyer *et.al.*, 2001; Tanaka *et.al.*, 1996; Tiffin e Gaut, 2001).

Os inibidores dessa família são representados por proteínas altamente estáveis, apresentando de 60 a 90 resíduos de aminoácidos e 8 a 10 kDa de massa molecular. Estes inibidores são constituídos por uma única cadeia polipeptídica com duas ou mais regiões internas repetidas (Birk, 1985). Uma característica marcante destas proteínas é a tendência a formação de dímeros (Birk, 1985; Kumar e Rao, 2004; Laskowski e Kato 1980; Rao e Suresh, 2007).

Além de variação na seqüência, os BBIs apresentam várias isoformas com seqüência de resíduos aminoácidos bastante similares devido a cisões na região N e C terminal (Prakash *et. al.*, 1996). Essas cisões ocorrem durante a maturação, quiescência e germinação de sementes, sendo resultantes da expressão de genes distintos durante essas fases (Odani e Ikenaka, 1973; Tan-Wilson *et. al.*, 1986).

Em monocotiledôneas estes inibidores apresentam variação de massa molecular de 8 a 20 kDa e o número de resíduos de cisteínas numa mesma molécula pode chegar a 26, existindo grande variabilidade (Prakash *et. al.*, 1996). Em dicotiledôneas os inibidores desta família são compostos por proteínas de baixa massa molecular, variando de 6 a 9 kDa, sendo caracterizados pela presença de 14 resíduos de cisteínas que formam sete ligações dissulfeto. Essas ligações permitem a formação de uma estrutura assimétrica

composta por dois domínios independentes localizados em extremos opostos da molécula, (Gariani e Leatherbarrow, 1997) que inibem simultaneamente e independentemente duas serinoproteases, não necessariamente idênticas, sendo um inibidor ambivalente (Birk *et. al.*, 1967; Krahn e Stevens 1970; Tan e Stevens, 1971).

O primeiro sítio reativo da maioria dos inibidores das dicotiledôneas inibe tripsina, enquanto que o segundo sítio inibe tripsina, quimotripsina ou elastase (Tsunogae *et. al.*, 1986; Qi *et. al.*, 2005). O resíduo P1' no segundo sítio reativo é bem variável podendo ser arginina, tirosina, leucina, fenilalanina ou alanina (Odani e Ono, 1980; Campos *et. al.*, 2004). Se o resíduo for uma alanina pode ser inibida a tripsina ou a quimotripsina, esta última com constantes de inibição com valores bem reduzidos (Castro e Anderson, 1996).

Filogeneticamente, Prakash e colaboradores (1996) separaram em grupos diferentes os inibidores de monocotiledôneas dos de dicotiledôneas. Segundo eles, os inibidores de monocotiledôneas de 8 kDa apresentam apenas a primeira alça de inibição que inibe tripsina e a segunda alça sofreu perda de função. Esses inibidores de uma alça originaram os inibidores de monocotiledôneas de 16kDa, que possuem duas alças inibitórias. Segundo Odani e colaboradores (1986), uma classe de inibidores com uma alça única de inibição encontrada em germe de trigo (monocotiledônea) sugere que estes sejam os inibidores ancestrais dos BBI com dupla alça de inibição. O fenômeno de duplicação dos resíduos 9 a 26 originando os resíduos 36 a 53 gerou, provavelmente, após mutações na região ativa, uma segunda alça de inibição para a quimotripsina (Hammond *et al.*, 1984). O fenômeno de duplicação dos resíduos foi inicialmente proposto por Tan e Stevens (1971). Ao contrário destes anteriores, os inibidores de dicotiledônea são todos de duas alças de inibição, que podem inibir um ou dois tipos de enzimas (Baek *et. al.*, 1994).

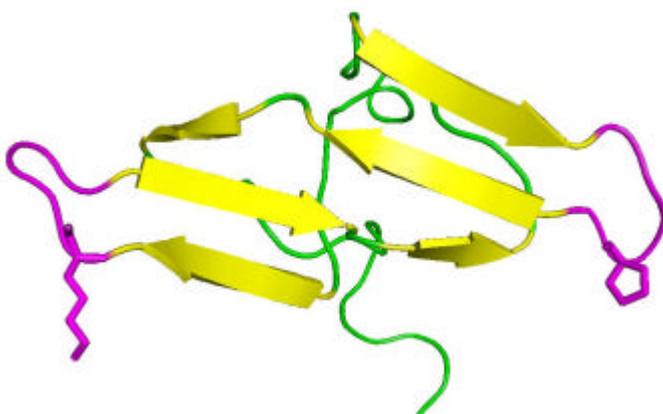
Os BBI são moléculas muito resistentes ao calor, força iônica e pH e à proteólise por proteases. Vários inibidores são resistentes a grandes intervalos de temperatura, normalmente 4 a 120°C, e variação de pH de 3 a 10 (Barbosa *et al.*, 2007; Birk, 1985; Lin *et. al.*, 1993; Chen *et. al.*, 1992; Silva *et. al.*, 2001). Esta estabilidade tem sido atribuída ao alto conteúdo de ligações dissulfeto e tamanho reduzido (Gerstenberg *et. al.*, 1980). O conhecimento da estabilidade, sob ação da temperatura e pH, constitui uma importante ferramenta nos processos de purificação dos BBI. A redução do conteúdo protéico de extratos brutos por desnaturação da maioria das proteínas, usando tratamentos baseados nessas propriedades, diminui a complexidade desses extratos e facilita a obtenção e o isolamento dos inibidores de proteases, uma vez que esses tratamentos não alteram a atividade inibitória.

#### **1.2.4 Estrutura dos inibidores de protease**

A primeira estrutura tridimensional de inibidores BBI obtida foi a do inibidor isolado de pâncreas bovino (Huber *et. al.*, 1970). Atualmente, várias estruturas de inibidores isolados de dicotiledôneas estão disponíveis em forma livre (figura 4) (DeLaSierra *et. al.*, 1999; Suzuki *et. al.*, 1993; Werner e Wemmer, 1992) em complexo binário com a tripsina (Lin *et. al.*, 1993; Tsunogae *et. al.*, 1986; Barbosa *et. al.*, 2007) e em complexo ternário com tripsina (Koepke *et. al.*, 2000).

As características particulares destas proteínas e o modelo de sua atividade inibitória são decorrentes da sua estrutura tridimensional. A conformação da alça de inibição complementar ao sítio ativo da enzima a ser inibida permite uma ligação bastante forte entre a enzima e o sítio reativo do inibidor (Lin *et. al.*, 199). Outra

característica importante é a baixa flexibilidade da alça de inibição. Esta conformação rígida do inibidor é originada pelo seu tamanho reduzido, pela presença de ligações dissulfeto, pela ocorrência de uma ou mais prolinas na alça, pela presença de uma treonina  $\beta$ -ramificada na posição P2 e pela formação de interações intramoleculares de hidrogênio entre os resíduos P5' (Gln) e P2 (Thr) e P1' (Ser) (Maeder *et. al.*, 1992). Em geral, os sítios reativos dos BBI são alças amplamente expostas, compostos por nove resíduos de aminoácidos característicos, incluindo o resíduo P1, que está completamente exposto (Bode e Huber, 1992; Radisky e Koshland, 2002; Barbosa *et. al.*, 2007). Alguns inibidores apresentam os mesmos valores dos ângulos diedrais phi e psi para os resíduos das alças inibitórias - tanto em forma livre, quanto em complexos.



**Figura 4.** Estrutura tridimensional de um inibidor da família bowman birk isolado de soja (PDB: 1bbi). Em magenta, os dois sítios reativos (P1, lisina e fenilalanina).

Apesar da existência da estrutura tridimensional dos inibidores na forma livre, ainda não existe nenhum complexo ternário com tripsina e quimotripsina com estrutura resolvida e depositada no PDB. Existe apenas na literatura um estudo de cristalização desse complexo cujos cristais difrataram em baixa resolução e não permitem obter as informações necessárias para que a estrutura tridimensional seja resolvida, (Gaier *et. al.*, 1981) e, atualmente, o trabalho publicado pelo nosso grupo de biofísica estrutural (Esteves *et. al.*, 2007) de cristais desse complexo ternário difratando a 2.8 Å. Além disso, não existe estrutura tridimensional de inibidores da família Bowman-Birk em complexos com a quimotripsina. O único

modelo tridimensional formado pelo inibidor em complexo com a quimotripsina foi construído baseado na homologia desses inibidores pelo nosso grupo de biofísica estrutural (Freitas *et. al.*, 1997).

### **1.2.5 Importância dos inibidores de protease**

Inicialmente, o estudo de inibidores de proteases foi motivado pela busca de desenvolvimento biotecnológico de variedades de plantas resistentes a insetos predadores (Richardson, 1977; Ryan, 1973). Hoje, os inibidores de protease estão relacionados a outras múltiplas aplicações tecnológicas em áreas econômicas e médicas (Fear *et. al.*, 2007). Como exemplo, esses inibidores são importantes no tratamento de distúrbios metabólicos associados às enzimas proteolíticas, como pancreatites, enfisema, alergias, inflamação, hipertensão e certos tipos de câncer (Richardson, 1991, Kennedy, 1998).

O efeito dessas moléculas está compreendido dentro de algumas categorias básicas como, efeito nas vias de sinalização, na inibição de proteases nucleares e na degradação da matriz extracelular (Garcia-Gasca *et. al.*, 2002). A sinalização por proteases difere da maioria das outras vias de sinalização por ser irreversível (Turk, 2006). Essa característica é importante para a busca de inibidores que possam atuar como fármacos.

Exemplos clássicos do sucesso da aplicação clínica biotecnológica do uso de inibidores de protease é o uso de inibidores de tripsina pancreática bovina tipo Kunitz para o tratamento de pancreatite e a produção de anticoagulante isolado de *Hirudo medicinalis* (Schoneich e Braun, 1986). Outras potenciais aplicações incluem: a inibição de proteases do vírus da dengue (Murthy *et. al.*,

2000), atuação em desordens inflamatórias e alérgicas pela inibição da Beta-triptase humana (Scarpi *et. al.*, 2004).

Evidências epidemiológicas têm mostrado que os inibidores diminuem a incidência dos principais tipos de câncer em humanos em população que consome alimentos que contenham estes inibidores (Huang *et. al.*, 1999) e apresentam ter efeito sobre a primeira etapa do processo de transformação em células tumorais (Kennedy e Little, 1981). Sabe-se que inibidores da família Bowman-Birk em especial podem atuar em diferentes tipos de câncer e em carcinomas induzidos por agentes químicos e físicos (Kennedy, 1978). Esses inibidores são agentes potenciais para atuar em diversas etapas da carcinogênese como na transformação em células tumorais, na atividade proteolítica alterada, na angiogênese, no crescimento tumoral e na metástase. Em abril de 1992, o órgão regulador americano FDA ("*Food and Drug Administration*"), delegou ao extrato de soja com concentrações altas do inibidor do tipo Bowman-Birk o status de nova droga a ser investigada.

A capacidade de BBI de suprimir a transformação de células *in vitro* e sua atividade antitumoral em sistemas modelo também foram diretamente demonstradas (Kennedy, 1993). Além disso, um potente efeito antiinflamatório tem sido associado à ingestão de BBI em vários estudos realizados em animais (Kennedy, 1998; Tikhonova *et. al.*, 1994).

Vários ensaios são realizados com os BBI para testar essa atividade, embora pouco se conheça sobre o mecanismo de ação desses agentes anticarcinogênicos. Aparentemente, o sítio inibitório de quimotripsina do BBI está envolvido no efeito supressor da transformação: o BBI enzimaticamente modificado que só inibe quimotripsina continua a ser totalmente eficaz como inibidor de transformação induzida por radiação, enquanto que o inibidor da protease que é apenas inibidor de tripsina não tem qualquer efeito

sobre a transformação induzida por radiação *in vitro* (Kennedy, 1982; Kennedy e Little, 1981; Yavelow *et. al.*, 1983).

Adicionalmente, o BBI estimula a internalização (localização nuclear) do receptor do fator de crescimento epidermal, EGFR, inibe sua ativação (Dittman *et. al.*, 2008 e 2003; Gueven *et. al.*, 1998) e estabiliza a atividade de tirosino-fosfatases específicas que interferem na ativação de EGFR (Gueven *et. al.*, 1998). O EGFR está envolvido em mais de 70% das neoplasias e foi encontrado estar hiperexpresso (100 vezes mais que o normal) em neoplasias clínicas agressivas (Yarden, 2001).

O BBI estimula a ativação de quinase dependente de DNA (DNA-PK), a qual participa no reparo de DNA de extremidades não homólogas (Dittman *et. al.*, 2003). A formação de cromossomos dicêntricos induzida por radiação foi reduzida significativamente após pré-tratamento de células com BBI, e o tratamento com BBI resultou em uma estimulação do nível basal da atividade de DNA-PK. Observou-se que o BBI exerce seu efeito radioprotetor por uma redução de reparo do DNA incorreta, resultando em uma diminuição da quantidade de cromossomos dicêntricos. Este efeito sobre a fidelidade de reparo do DNA é dependente do gene TP53 e está correlacionado com a indução da atividade de DNA-PK.

As áreas de maior interesse para terapias com o uso de inibidores de proteases são: cardiovascular, inflamatória, doenças infecciosas e o câncer. Nessas áreas o BBI tem sido utilizado com resultados promissores. Recentemente estudos farmacológicos visando à terapia das doenças neurodegenerativas têm sido abordados com o potencial uso dos inibidores de proteases – dentre as quais o BBI já mostra resultados no caso da esclerose múltipla (Gran *et. al.*, 2008; Touil *et. al.*, 2006). O BBI pode ser administrado por via oral, e é seguro e relativamente barato. Ele pode ter um papel

terapêutico em pacientes com esclerose múltipla sendo uma alternativa ao tratamento de injeções diárias e com alto custo.

O BBI pode atuar de forma preventiva e curativa se utilizado em modelos animais que sofrem esclerose múltipla. A administração via oral do BBI em ratos durante a indução ou na fase efetora da doença promoveu atraso no início da doença e a diminuição da gravidade da doença clínica e patologicamente, em todos os protocolos de tratamento. *In vitro* e *ex vivo*, BBIC inibiu a proliferação de células linfáticas no sistema nervoso central de ratos tratados (Gran *et. al.*, 2006). O tratamento com BBI melhorou significativamente os parâmetros que caracterizam essa doença (tempo para início, gravidade, perda de peso, inflamação e desmielinização). O BBI reduziu significativamente a incidência de neurite óptica e previniu a perda de células ganglionares da retina. Na maioria dos experimentos a proliferação de células imunes derivadas foi significativamente menor dos camundongos tratados com BBI em relação ao grupo controle. O BBI reduz a inflamação e atenua a perda de neurônios, tornando-o um excelente candidato para a terapia oral em esclerose múltipla, e a provável melhora se deve a inibição de múltiplos caminhos envolvidos na patogênese da doença (Touil *et. al.*, 2008). Finalmente, vale ressaltar que proteases atualmente são consideradas alvos em potencial por estarem associadas a doenças crônicas, e são, portanto, juntamente com os inibidores de proteases, campos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas.

### **1.3 Objeto de estudo**

O inibidor objeto do presente estudo foi isolado de *Vigna unguiculata*, conhecido como feijão-de-corda (Ventura e Filho, 1966).

Esta é uma importante cultura tropical de alto valor nutricional para as populações carentes das regiões norte e nordeste do Brasil, bem como de países dos continentes asiáticos e africanos. O feijão é frequentemente submetido a severas condições de estresses ambientais, já que é principalmente cultivado por pequenos produtores cujos sistemas de manejo agrícolas em geral são carentes de insumos e defensivos.

O inibidor a ser estudado nesse projeto "Black eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor" – BTCI - é membro da família Bowman-Birk e tem sido extensivamente estudado sob o ponto de vista biofísico estrutural. A seguir estão apresentadas as características importantes e propriedades desse inibidor. O BTCI é composto por uma cadeia polipeptídica única de 83 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 9,1 kDa. A sequência dos resíduos de aminoácidos foi determinada por Morhy e Ventura em 1987 (Morhy e Ventura, 1987). O BTCI contém apenas um único resíduo de triptofano, um resíduo de tirosina e três resíduos de fenilalanina. Os resíduos de fenilalanina estão em regiões expostas ao solvente (Barbosa *et. al.*, 2007; Mizuta *et. al.*, 1983). Os estudos de atenuação de fluorescência estática com íons iodeto, de espectroscopia de termoperturbação e de espectroscopia de diferença com perturbação pelo solvente indicaram que o único resíduo de triptofano também está completamente exposto ao solvente (Morhy e Ventura, 1978; Martin e Ventura, 1983; Ventura, *et. al.*, 1984; Ventura e Aragão, 1977).

O espectro de dicroísmo circular do BTCI e de outros inibidores nativos é semelhante aos espectros de proteínas em conformação desordenada e constrangida. Um estudo conformacional do BTCI, por dicroísmo circular, indicou que esta proteína não apresenta estrutura do tipo alfa-hélice. Espectros de infravermelho sugerem a ocorrência de estruturas desordenadas, folhas betas antiparalelas e grampos

betas (Aragão e Ventura, 1986; Barbosa *et. al.*, 2007; Freitas e Ventura, 1996). A estrutura nativa apresenta 7 ligações dissulfeto, que lhe conferem estabilidade conformacional, mantendo sua atividade de inibição após a exposição a temperaturas de até 95°C e a uma variação de pH de 3 a 11 (Silva *et. al.*, 2001). Estas ligações podem ser reduzidas e novamente oxidadas com correspondente variação na sua atividade inibitória. No entanto, o rompimento das ligações dissulfeto provoca uma alteração significativa da conformação deste inibidor (Mizuta *et. al.*, 1982).

O BTCl apresenta dois sítios reativos diferentes e independentes responsáveis pela inibição simultânea de quimotripsina e tripsina, respectivamente (Ventura e Filho, 1966). O sítio reativo para a tripsina compreende os resíduos Lisina 26 e Serina 27 e, para a quimotripsina, os resíduos Fenilalanina 53 e Serina 54. Os complexos estáveis de BTCl-Tripsina, BTCl-Quimotripsina e o complexo ternário apresentam estequiometria de 1:1, 1:1 e 1:1:1, respectivamente (Ventura *et. al.*, 1975).

A associação do BTCl com a tripsina, com uma constante de associação da ordem de  $10^{-8}$  M é um processo endotérmico, que ocorre com aumento significativo da entropia, ocasionado pela liberação de moléculas de água localizadas na região de contato entre as duas proteínas (Fachetti *et. al.*, 1984). As constantes de equilíbrio da ligação da quimotripsina ao BTCl foram estimadas para várias temperaturas e os valores encontrados variam entre  $0,32 \times 10^7$  a  $1,36 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>. Os resultados indicam que a ligação de quimotripsina de BTCl é um processo entropicamente favorável (Freitas *et. al.*, 1999).

Quando a tripsina interage com o BTCl, aproximadamente um grupo triptofil torna-se inacessível ao solvente. O ambiente deste cromóforo torna-se menos polar, em consequência da interação da enzima com o inibidor. Este resíduo volta-se para regiões mais

internas da molécula. No caso da formação do complexo ternário, os resultados obtidos por termoperturbação não indicaram diferença no total de grupos triptofis expostos e enterrados (Morhy e Ventura, 1978).

Além disso, podem ocorrer interações entre subunidades do BTCl em concentrações acima de 0,082 g/dL, correspondendo a um sistema auto-associante com o equilíbrio entre as formas de monômero e hexâmero (Ventura *et. al.*, 1981). Essa tendência de auto associação foi confirmada pela detecção de estados multiméricos do BTCl em formas globulares-elipsóides que foram identificados a partir de estudos de microscopia de força atômica e análises computacionais (Silva *et. al.*, 2005). Pelos cálculos de volume molecular foram encontradas formas estáveis de auto-associação do BTCl, havendo um equilíbrio entre a formação de monômeros-dímeros-trímeros e hexâmeros.

O BTCl é um inibidor que pode ser utilizado em um grande espectro de atuação aplicações biotecnológicas. Nesse sentido, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos visando a aplicação desse inibidor em principalmente duas áreas importantes da aplicação biotecnologia.

O BTCl pode atuar como controle de pragas para o bicudo do algodoeiro, apresentando alta taxa de mortalidade (65%) de larvas e impedindo o desenvolvimento do inseto adulto (Franco *et. al.*, 2003). O BTCl também apresentou resultados importantes no controle da homeostase nos rins impedindo a degradação da função renal e aumentando do fluxo urinário, excreção de sódio e aumento da filtração glomerular (Santos-Neto *et. al.*, 2008). Todas essas características estão relacionadas com a homeostase. Além disso, uma recente publicação comprova o potencial citostático e citotóxico do BTCl na linhagem carcinogênica de câncer de mama MCF7 (Joanitti *et. al.*, 2010).

A estrutura do BTCI em complexo com a tripsina foi resolvida e refinada em 1,55 Å. A interface de contato é estabilizada por contatos hidrofóbicos e ligações de hidrogênio, envolvendo duas águas e uma molécula de polietileno glicol. A estrutura do complexo ternário do BTCI com a tripsina e a quimotripsina foi resolvida em dois pHs diferentes (pH 7,5 e 4,5) a uma resolução de 1,70 Å e 1,63 Å respectivamente, sendo a primeira estrutura de complexo ternário com tripsina e quimotripsina existente. Estes resultados fazem parte desta tese e serão discutidos mais à frente.

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora intensivamente estudados sob o ponto de vista bioquímico e estrutural, o mecanismo de ação dos inibidores de serinoproteases ainda é objeto de investigação científica. Estruturas tridimensionais de outros inibidores pertencentes à família Bowman-Birk em forma livre (Werner e Wemmer, 1992; Suzuki *et. al.*, 1993; Voss *et. al.*, 1996; Catalano *et. al.*, 2003) e em complexo com a tripsina (Park *et. al.*, 2004, Barbosa *et. al.*, 2007) já foram resolvidas. Entretanto nenhuma estrutura de complexo com quimotripsina foi ainda resolvida, sendo os estudos estruturais no nível atômico realizados apenas a partir de complexos obtidos por meio da técnica de modelagem molecular (de La Sierra *et. al.*, 1999; Freitas *et. al.*, 1997). A estrutura do complexo ternário de inibidores Bowman-Birk com tripsina e quimotripsina não foi ainda elucidada, e as estruturas cristalográficas depositadas no pdb de complexos ternários, são todas elas representadas pelo BBI (“Bowman-Birk Inhibitor”) complexado com tripsina.

Um estudo estrutural a partir das estruturas cristalográficas de complexos binários do BTCI com a tripsina e a quimotripsina e o complexo ternário com ambas é fundamental para a caracterização da afinidade e comportamento dos resíduos de aminoácidos responsáveis por essa interação. Também é necessário avaliar a dinâmica desta interação relacionada às mudanças conformacionais que ocorrem durante o processo de formação de complexos.

O BTCI é uma molécula com grande potencial de aplicação biotecnológica: sua atividade já foi comprovada como efetivo controle de pragas para o bicudo do algodoeiro, apresentando a taxa de mortalidade de 65% dos insetos e larvas, o que sugere fortemente que o BTCI pode atuar como uma proteína transgênica para uso em plantas de cultivo geneticamente modificado para resistência

aumentada contra o bicudo do algodoeiro (Franco *et. al.*, 2003). O BTCI apresentou efeitos significativos na regulação da homeostase de fluidos e eletrólitos pela via da guanilato ciclase expressa nos rins. A utilização do BTCI impediu a degradação da função renal promovendo aumento no fluxo urinário, aumento na excreção de sódio e aumento na taxa de filtração glomerular (Santos-Neto *et. al.*, 2008). Além disso, já foi comprovado o potencial anticarcinogênico do BTCI, que apresentou efeitos citostáticos e citotóxicos em linhagem carcinogênica, associados à indução da apoptose e da permeabilização da membrana de lisossomos em células de câncer de mama, considerada uma das neoplasias malignas mais freqüentes e agressivas no Brasil e no mundo (Joanitti *et. al.*, 2010). Parte de resultados dessa linha de pesquisa resultou recentemente no depósito de uma patente, que tem sido analisada por grupos de pesquisa de interesse tecnológico no Brasil.

Os dados a serem obtidos a partir do desenvolvimento dessa tese, em conjunto com outras características físico-químicas e estruturais determinadas com o desenvolvimento de pesquisas do grupo de Biofísica estrutural do laboratório de biofísica, sob a supervisão da Prof Dra Sonia Maria de Freitas, são essenciais para caracterização do movimento intrínseco da molécula e do mecanismo de interação e reconhecimento entre estas proteínas. Certamente esses resultados facilitarão a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação desse inibidor nas áreas citadas, além de possibilitar o desenho de partes estruturais da molécula para serem testadas em ensaios de atividade anticarcinogênica e ensaios de regulação da homeostase.

Adicionalmente, a resolução das estruturas tridimensionais dos complexos descritos neste projeto é fundamental para o desenho racional e a produção biotecnológica de proteínas recombinantes que possam atuar de forma mais eficiente em diversas funções como: agentes defensivos contra ataque de predadores em plantas, agentes

preventivos ou quimioterápicos contra o câncer, atuação preventiva e curativa na esclerose múltipla (Gran *et. al.*, 2006; Touil *et. al.*, 2008), em atuações no sistema imune – sistema respiratório, sistema de defesa e pele, na regulação da homeostase, agentes antivirais (SARS, Hepatite C, Dengue, HIV), agentes antibactericidas (tuberculose, anthrax), agentes antifúngicos (candida), agentes antiparasíticos, (chagas, malária) dentre outros (Joanitti *et. al.*, 2006).

Este projeto representa uma pesquisa de grande impacto científico e está sendo desenvolvido utilizando parte da infraestrutura dos laboratórios de Biofísica e do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e faz parte de uma linha de pesquisa multidisciplinar coordenada pela Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas do grupo de Biofísica estrutural da Universidade de Brasília. Vale ressaltar que o BTCl, objeto de estudo dessa tese, é alvo de pesquisa do laboratório de biofísica há mais de 35 anos, anteriormente coordenada pelo Prof. Emérito Dr. Manuel Mateus Ventura e hoje supervisionada pela Dra Sonia M de Freitas.

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo das interações do BTCI com as enzimas quimotripsina e tripsina em complexos binário e ternário por fluorescência dinâmica e a partir das estruturas cristalográficas desses complexos a serem determinadas nesse trabalho por difração de raios X.

#### 3.1 Objetivos específicos

- ◆ Purificação e cristalização do complexo binário BTCI – tripsina.
- ◆ Resolução da estrutura tridimensional do complexo binário BTCI – tripsina.
- ◆ Análise comparativa da estrutura tridimensional do complexo binário com outros complexos de inibidores de tripsina.
- ◆ Análise dos contatos intermoleculares característicos da ligação do BTCI – tripsina.
- ◆ Purificação e cristalização do complexo ternário quimotripsina – BTCI – tripsina.
- ◆ Resolução da estrutura tridimensional do complexo ternário quimotripsina – BTCI – tripsina.
- ◆ Análise das interfaces e mudanças estruturais no complexo ternário quimotripsina – BTCI – tripsina.
- ◆ Análise da estabilidade térmica dos complexos por técnica de dicroísmo circular.
- ◆ Análise da acessibilidade dos triptofanos dos complexos pela técnica de fluorescência dinâmica.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção do extrato bruto de *Vigna unguiculata***

O BTCl foi isolado de sementes do feijão *Vigna unguiculata* (variedade seridó). 500g de sementes trituradas foram mantidas sob agitação constante em 2 L de água destilada por 12 horas a uma temperatura de 4°C. A mistura foi homogeneizada em um liquidificador por 15 minutos, filtrada e centrifugada a 8000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi reservado. Uma nova extração das proteínas contidas no precipitado foi realizada com 1 L de água por mais 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos em 4°C e o sobrenadante reservado.

O material foi precipitado com TCA 2,5%, em seguida precipitado em sulfato de amônio 50%. Após filtrar a 4°C, foi centrifugado por 8000 g por 40 minutos a 4°C, coletando-se o precipitado. O extrato foi dialisado para remoção dos sais por 12 horas a 4°C e liofilizado para posterior utilização.

### **4.2 Purificação do btci**

O material liofilizado foi ressuspensão em tampão fosfato 0,01 M pH 7,3 para a purificação em cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. O inibidor a ser purificado foi eluído em um gradiente de 0-0,8 M de NaCl em um fluxo de 4 mL/min. A presença de proteínas foi monitorada por absorvância em 280 nm e a confirmação da pureza foi feita por gel de poliacrilamida 13% em condição desnaturante.

### **4.3 Obtenção e purificação dos complexos**

Para a obtenção dos complexos as misturas de trispina, quimotripsina e BTCl purificado foram realizadas em uma solução Tris

0,05 M pH 7,5 KCl 0,2 M na razão molar 1:1 nos complexos binários (BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina) e 1:1:1 no complexo ternário (tripsina-BTCl-quimotripsina) em uma concentração de 500 mM. As misturas foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente.

O complexo ternário tripsina-BTCl-quimotripsina foi obtido em duas etapas. Em primeiro lugar, BTCl e tripsina foram dissolvidos em uma proporção de 1:1 em solução Tris 0,05 M pH 7,5 KCl 0,2 M por 30 minutos em temperatura ambiente. A quimotripsina foi então adicionada a esta solução, que foi incubada por um período adicional de 30 min. Todas as três proteínas foram diretamente dissolvidas no tampão para relação 1:1:1 em uma concentração de 500 mM

Os complexos formados foram purificados de acordo com a metodologia de Ventura *et. al.*(1975) por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 em um fluxo de 25 mL/h. A eluição das proteínas foi monitorada por absorvância em 280 nm e a confirmação da pureza foi feita por gel de poliacrilamida 13% em condição não-desnaturante.

#### **4.4 Cristalização dos complexos**

O material purificado foi cristalizado pelo método de difusão de vapor em placas de gota sentada utilizando as soluções de kits comerciais e a metodologia de matriz esparsa. Foram utilizados kits da Hampton Research para os ensaios iniciais. Neste trabalho esse processo foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 21°C. Uma gota contendo 2 µL de proteína em solução aquosa na concentração de 8 mg/mL foi misturada a 2 µL de solução do reservatório e foi equilibrada contra 300 µL dessa mesma solução do reservatório. O acompanhamento do experimento foi realizado por meio da observação das gotas em lupa, nas placas de cristalização

lacradas, com a menor perturbação possível. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, as condições que apresentarem cristais foram submetidas a sucessivos refinamentos até se conseguir cristais que apresentem 2 dimensões maiores que 0,2 mm.

Foram obtidos cristais em diversas condições, mas somente duas em dois pHs diferentes foram escolhidas para a resolução e refinamento, sendo em 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5, 0,5 M de sulfato de amônia e 30% de 2-metil 2,4-pentanodiol (MPD) e 0,1M de acetato de sódio pH 4,5, 0,1 M de cloreto de cobalto hidratado e 1 M de hexanodiol. A coleta de dados dos cristais foi realizada na linha de cristalografia de proteínas MX1 do LNLS.

#### **4.5 Coleta de dados**

A coleta de dados foi realizada na linha MX1-D03B do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron a  $\lambda = 1.427 \text{ \AA}$ . Os cristais foram banhados em uma solução crioprotetora formulada de acordo com as condições de obtenção de cada cristal, e só então montados em loops de nylon. A coleta foi feita com o cristal resfriado instantaneamente num fluxo de nitrogênio gasoso a aproximadamente 100 K. Isto permitiu a redução dos efeitos danosos da radiação direta e aumentou o tempo de vida do cristal.

Cada conjunto de imagens geradas de um cristal forma um conjunto de dados a ser analisado. É possível realizar várias coletas e escolher o melhor conjunto de dados. Além disso, os dados coletados a frio apresentam melhor qualidade, pois o resfriamento mantém o nível de organização interna do cristal, necessária para coleta de dados, preservação da rede cristalina, informação expressa nos resultados pela mosaicidade. Para a coleta foi utilizado um detector MarCCD 165 mm. A distância do detector ao cristal foi regulada de

forma a chegar o mais próximo possível da melhor resolução, limitada pela qualidade do cristal. A coleta foi feita com oscilação do cristal a cada 1° com o máximo de reflexões possíveis, visando maior completeza de dados.

De posse das imagens (360 imagens), os dados (intensidades) foram indexados utilizando o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997), para a determinação do grupo espacial, das dimensões e orientação da célula unitária, e estimar a mosaicidade. A partir da medida da distância e dos eixos da rede recíproca do padrão de difração foi possível determinar o tamanho e os eixos do cristal no espaço real.

No processo de integração foi quantificada a intensidade do ponto, retirando-se a contribuição proveniente da difração do solvente. Cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem intensidades gravadas em uma escala diferente umas das outras, por diversos motivos como a variação na radiação incidente, absorção dos raios difratados ou destruição do cristal. Portanto, é necessário colocar todos os pontos em uma mesma escala. Após esse passo foi realizada o somatório dos dados: os pontos com o mesmo índice de Miller foram somados e as intensidades correspondentes aos pontos que foram agrupados como reflexões equivalentes simétricas de diferentes imagens foram também somadas.

Após essa etapa é possível determinar o grupo espacial e estimar a mosaicidade, a completeza, o  $R_{\text{merge}}$  e o  $R_{\text{symm}}$  – que são parâmetros de medida de qualidade do modelo. A completeza representa a porcentagem do número de reflexões observadas em relação ao número de reflexões possíveis para uma determinada resolução, que está limitada pela qualidade do cristal. Uma completeza de 100% é o resultado desejável, com a maioria das reflexões medidas várias vezes. A mosaicidade indica o nível de organização interna do cristal. O  $R_{\text{merge}}$  é um parâmetro de

concordância entre as várias medidas de intensidade de uma mesma reflexão de imagens ou conjunto de dados diferentes, que indica o quanto elas concordam ou discordam. Já que, na realidade todas as medidas de um mesmo ponto não apresentam a mesma intensidade, dependendo da orientação do cristal.  $R_{\text{symm}}$  por sua vez, é um parâmetro que relaciona, da mesma forma, as medidas de intensidade de reflexões simetricamente relacionadas de imagens ou conjunto de dados diferentes (McRee, 1993).

#### **4.6 Construção do modelo**

O mapa de densidade eletrônica é que permite a construção de um modelo de estrutura tridimensional. A fim de obter esse mapa de densidade de elétrons, a amplitude e fase devem ser conhecidas. Durante um experimento de difração a fase não pode ser diretamente gravada: isto é conhecido como o problema de fase. A fase inicial pode ser obtida por diversas técnicas, uma delas é a substituição molecular.

Se uma estrutura relacionada é conhecida, ela pode ser usada como um modelo de busca em substituição molecular para determinar a posição e orientação das moléculas dentro da célula unitária. Partindo da observação de que moléculas com seqüências primárias homólogas apresentam enovelamentos similares, o conhecimento destas moléculas estruturalmente conhecidas, permite simular um experimento com um modelo inicial do cristal a ser resolvido, e deste modelo obter as informações necessárias sobre a fase da radiação difratada pelo cristal real. Mas para isso é necessário saber quantas moléculas estão presentes na unidade assimétrica.

Após a integração e indexação e a partir dos dados da dimensão da célula unitária é calculado o coeficiente de Matthews. O coeficiente de Matthews permite estimar quantas moléculas estão

presentes na unidade assimétrica. Conhecendo o número de moléculas na unidade assimétrica é possível realizar o processo de substituição molecular, o que permite a obtenção do primeiro modelo inicial da estrutura tridimensional. O método da Substituição Molecular foi utilizado neste trabalho com a estrutura do inibidor de *Phaseolus angularis* (PDB: 1TAB Tsunogae *et. al.*, 1986) como modelo inicial, utilizando o programa MOLREP do pacote CCP4 (Vagin e Teplyakov, 1997).

O programa utilizado calcula funções de movimentos de rotação e translação do modelo, cujas coordenadas espaciais de seus átomos referem-se ao seu posicionamento no próprio cristal. De posse das rotações e translações necessárias para posicionar o modelo corretamente na cela unitária, estas transformações são aplicadas e o fator de estrutura ( $F_{calc}$ ) é calculado. As fases obtidas para cada reflexão são assumidas como as fases correspondentes aos fatores de estrutura observados, e esta informação será utilizada como ponto de partida de um processo de refinamento, para obtenção da estrutura efetiva da molécula difratada.

#### **4.7 Refinamento do modelo**

Após a construção do primeiro mapa de densidade eletrônica, a estrutura do modelo foi minimizada utilizando o método de *Simulated annealing* com o programa CNS (Brunger *et. al.*, 1998), visando à acomodação inicial e energética dos átomos à densidade eletrônica. Esse método simula a dinâmica molecular de um sistema, elevando-o até altas temperaturas e resfriando o sistema gradualmente até a temperatura ambiente. A idéia principal do método é aquecer a molécula para que os átomos adquiram altas velocidades e energias cinéticas suficientes para vencerem as barreiras de potencial energético e, quando a temperatura chegar à temperatura ambiente,

a estrutura tenha alcançado o seu mínimo energético, com convergência máxima (McRee, 1993).

Refinamento é o processo de encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto e os dados observados do experimento. Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados ( $F_{\text{calc}}$ ) e os fatores de estrutura observados ( $F_{\text{obs}}$ ). Cada refinamento realizado com o programa Refmac do pacote CCP4 foi seguido por uma intervenção manual, utilizando o programa gráfico "WinCoot" (Emsley e Cowtan, 2004) para ajustes da geometria da molécula, otimização dos ângulos das cadeias laterais, otimização das dimensões das ligações covalentes, enquadramento da cadeia principal e cadeias laterais no mapa de densidade eletrônica seguindo o padrão das dimensões das ligações, ajustes do mapa de densidade eletrônica para as densidades negativas e positivas. É necessária a realização de vários ciclos de refinamento para que todos os átomos do modelo representem de maneira mais fiel possível a realidade experimental medida, e, além disso, estejam no melhor posicionamento possível levando em conta a geometria das moléculas, valores dos ângulos e dimensão das ligações covalentes. O processo de refinamento visa trazer o valor de ( $F_{\text{calc}}$ ) o mais próximo possível de ( $F_{\text{obs}}$ ), variando as coordenadas atômicas e o fator de temperatura  $B$ , porém, sempre respeitando as restrições estereoquímicas e eletrostáticas.

O acompanhamento da qualidade deste processo é feito por meio do cálculo do fator R durante o processo. O fator R é uma medida da similaridade entre o modelo cristalográfico utilizado e os dados experimentais da difração de raios-X. Em outras palavras, é uma medida de quão bem a estrutura refinada prevê os dados observados no experimento de difração de raios-X (Morris *et. al.*, 1992). Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X, uma pequena

porcentagem das reflexões são excluídas do refinamento e utilizadas como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado  $R_{free}$ , que é isento de minimização artificial. Todas as etapas do refinamento foram monitoradas nos arquivos “.log” do CCP4, com ênfase para os valores da convergência dos fatores de estrutura para valores compatíveis para estruturas de qualidade estrutural ( $R_{factor} < 20\%$  e  $R_{free}$  o mais próximo do valor do  $R_{factor}$ ).

Após vários ciclos de refinamento para posicionar os átomos das proteínas, as moléculas de água foram adicionadas com o programa REFMAC (Murshudov *et. al.*, 1999) do pacote CCP4. Todas as interações das águas com a interface molecular e o solvente foram otimizadas considerando-se as dimensões das ligações de hidrogênio. Os heteroátomos provenientes da solução de cristalização (Kleywegt e Jones, 1998 - <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>) foram inseridos em seus mapas de densidade eletrônica correspondentes, seguidos de vários ciclos de refinamento utilizando o programa REFMAC (Murshudov *et. al.*, 1999).

#### **4.8 Análise do modelo**

O arquivo pdb gerado no último ciclo do refinamento foi avaliado quanto aos vários parâmetros de qualidade estereoquímica, utilizando o site do PDB ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) com os programas de validação da estrutura tridimensional e o *Wincoot*.

A estrutura tridimensional do inibidor e de seus complexos foi comparada entre si por meio do alinhamento estrutural realizado com o programa *Superpose* (Maiti *et. al.*, 2004). Nas comparações utilizou-se como parâmetro o valor das posições relativas dos átomos, a partir do cálculo do r.m.s.d. (*root mean square deviation*). A partir desses dados, a análise estrutural foi realizada com foco nos resíduos

presentes nas regiões de contato. Também foram realizadas análises estruturais das modificações conformacionais encontradas quando as diversas estruturas tridimensionais foram comparadas, a fim de avaliar as mudanças decorrentes da formação do complexo.

A análise das estruturas em diferentes pHs (4,5 e 7,5) foi realizada a partir do alinhamento estrutural realizado com o programa *Superpose* (Maiti *et. al.*, 2004) utilizando os valores do RMSD como parâmetros. A partir desses dados, a análise estrutural foi realizada com o auxílio do programa de visualização molecular PYMOL (DeLano, 2002) para observação individual e comparação do posicionamento das cadeias laterais de cada resíduo das proteínas.

Para analisar a flexibilidade do *loop* que contém os sítios reativos no BTCI, a comparação entre a média do fator B (fator de temperatura) para os resíduos do BTCI em complexo ternário foi realizada. O fator B é uma medida que reflete a flutuação dos átomos em torno da sua posição média e fornece informações importantes sobre o movimento atômico (Yuan *et. al.*, 2005). A média dos fatores de temperatura de uma região permite avaliar se ela é rígida ou flexível. A análise e a comparação do fator de temperatura foi realizada para os sítios reativos do BTCI e para toda a cadeia do BTCI em complexos binário e ternário.

#### **4.9 Espectroscopia de fluorescência dinâmica**

A técnica de fluorescência dinâmica visa fornecer informações sobre a dinâmica das biomoléculas, a partir da avaliação da posição dos triptofanos na escala temporal de nanosegundos, além de informações sobre a acessibilidade das moléculas de solvente fluorescentes. Proteínas com sondas fluorescentes intrínsecas têm um tempo de vida associada ao processo de emissão. Este tempo de vida pode ser influenciado pelas interações com o meio ambiente

e por associações entre macromoléculas. A proximidade de atenuadores de fluorescência, a presença de oxigênio, alterações no pH, temperatura, viscosidade do meio podem alterar a conformação da proteína que reflete na intensidade da emissão fluorescente e por conseqüência, no valor do tempo de vida.

O objetivo das medidas resolvidas no tempo é determinar a forma de decaimento da intensidade do sinal fluorescente e interpretar o decaimento em termos das características físico-químicas da amostra e o seu ambiente molecular (Lakowicz, 1999). No caso de um único tipo de fluoróforo, os dados resolvidos no tempo podem indicar se este fluoróforo está presente em um ou mais ambientes distintos (já que o tempo de vida é sensível ao ambiente que circunda o fluoróforo), se o fluoróforo sofre reações quando no estado excitado (por exemplo, a transferência de energia) e dar informações sobre o tamanho, forma e mobilidade das moléculas (com medidas de anisotropia).

A medida do tempo de vida do estado excitado de uma molécula (elétrons de seu fluoróforo) pode ser obtida por duas técnicas: no domínio do tempo ou no domínio da frequência.

A técnica utilizada neste trabalho foi a do domínio da frequência, na qual a frequência de excitação da luz emitida (em megahertz) é modulada para observar a flutuação da intensidade de emissão, em resposta à excitação. A modulação de amplitude e o atraso da fase então são considerados para determinar o tempo de vida (Gratton e Jameson, 1984). Neste trabalho utilizamos como fonte de luz a radiação síncrotron, pois o sinal é mais intenso e possibilita a utilização de amostras bem mais diluídas.

O BTCl, ou o complexo a ser analisado foi pesado e dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl<sub>2</sub> 50 mM pH 7,6, centrifugado a 12.000 rpm durante 20 minutos. A concentração ideal para obtenção das medidas foi de 22 µM para o complexo binário com tripsina, 50

$\mu\text{M}$  para o complexo binário com quimotripsina e  $80 \mu\text{M}$  para o complexo ternário. As medidas do tempo de vida do BTCI puro foram realizadas com concentração de  $50 \mu\text{M}$  em pH 7 (Tris-HCl  $50 \text{ mM}$ ). Todas as medidas foram realizadas a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$700 \mu\text{L}$  de cada solução foram acondicionados em uma cubeta (caminho ótico:  $1 \text{ cm}$ ) de quartzo para a leitura do tempo de vida da fluorescência em um espectrofluorímetro K-2, acoplado à fonte de radiação Síncrotron, no LNLS (Campinas, SP). As medidas do tempo de vida foram realizadas com um número de frequência de  $20 \text{ MHz}$  a partir de  $8$  a  $200 \text{ MHz}$ . Todas as medidas foram realizadas na configuração "magic-angle", isto é, o decaimento da intensidade de fluorescência é frequentemente medido por um polarizador orientado a  $54,7^\circ$  a partir do eixo vertical (eixo-z). Esta condição é usada para evitar os efeitos da difusão rotacional e/ou anisotropia no decaimento da intensidade (Lakowicz, 1999). A temperatura foi mantida a  $25^\circ\text{C}$  por um termostato externo ao espectrofluorímetro.

O sinal do equipamento, correspondente à resposta do fotomultiplicador, foi calibrado com a solução de referência *p*-terfenil, cujo tempo de vida é de  $1,05 \text{ ns}$ . O comprimento de onda de excitação foi de  $295 \text{ nm}$ , conservando ambos os "slits" (excitação e emissão) em  $1 \text{ mm}$ . O filtro UV-320 foi utilizado para evitar a interferência do espalhamento da luz. Esse filtro serve para excluir a luz que não corresponde à fluorescência.

Os dados de desmodulação (razão de modulação) e deslocamento de fase foram analisados pelo software VINCI (ISS Inc.) e os gráficos foram feitos utilizando o programa Origin Pro 8,0 (OriginLab Corporation). Todos os dados foram analisados com diferentes modelos incluindo um, dois e três tempos de vida. O ajuste dos dados foi baseado no valor mínimo do  $\chi^2$ , o qual foi calculado usando os desvios padrões de  $\pm 0,2^\circ$  e  $\pm 0,004$  para o ângulo de fase e a desmodulação, respectivamente.

#### 4.10 Estabilidade térmica

A desnaturação térmica dos complexos do BTC1 foi acompanhada por espectroscopia de dicroísmo circular. Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-810 cuja temperatura da câmara da cubeta é controlada por sistema tipo *Peltier* PFD 425S. As soluções de proteína foram preparadas na concentração de 0,3 mol/L em 2 mM HEPES pH 7,0 .

Os dados foram coletados utilizando-se varredura de 50 nm/min e intervalo de dados de 0,5 nm. O programa utilizado para registro e tratamento dos dados foi o Spectra Manager (JASCO), com o auxílio do programa Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation).

As elipticidades a 204 nm das soluções de proteína foram medidas em cubetas de quartzo de 0,2 cm. Ensaios de desnaturação térmica foram realizados elevando-se a temperatura de 20 a 95°C. Ao final do experimento foi realizado um espectro no comprimento de onda UV distante (190 a 260 nm). Cinco medidas consecutivas foram acumuladas e foi utilizada a média dentre estes cinco espectros. As elipticidades observadas em miligráus foram convertidas em elipticidade residual molar  $[\theta]$  baseando-se no valor da massa molecular média de 112 por resíduo. Os dados foram corrigidos com a linha de base para retirar a contribuição do tampão.

As curvas de transição foram ajustadas de acordo com o modelo de dois estados e normalizadas de acordo com a calibração do aparelho realizada por uma solução livre de proteína nas mesmas condições. A fração de proteína presente no estado desdobrado ( $f_U$ ), a constante de equilíbrio ( $K$ ) para estas transições e os valores dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$f_U = (y_F - y) / (y_F - y_U) \quad (1)$$

$$K = [U] / [N] = f_U / (1 - f_U) = (y_F - y) / (y - y_U) \quad (2)$$

$$\Delta G = - RT \ln K = - RT \ln [(y_F - y) / (y - y_U)] \quad (3)$$

onde  $y_F$  e  $y_U$  representam as frações de proteína que estão no estado nativo e desnaturado, respectivamente.

A temperatura de transição  $T_m$  correspondente ao ponto central da curva de desnaturação térmica será calculada a partir do gráfico  $\Delta G$  vs  $T$ , para  $\Delta G = 0$  ( $\Delta G = 0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$ ). A inclinação desse gráfico em  $T_m$  corresponde a  $\Delta S_m$  e a entalpia em  $T_m$  é  $\Delta H_m = T_m \Delta S_m$ .

A energia entálpica de van't Hoff foi calculada a partir da equação de van't Hoff (4):

$$d(\ln K_D) / d(1/T) = - \Delta H/R \quad (4)$$

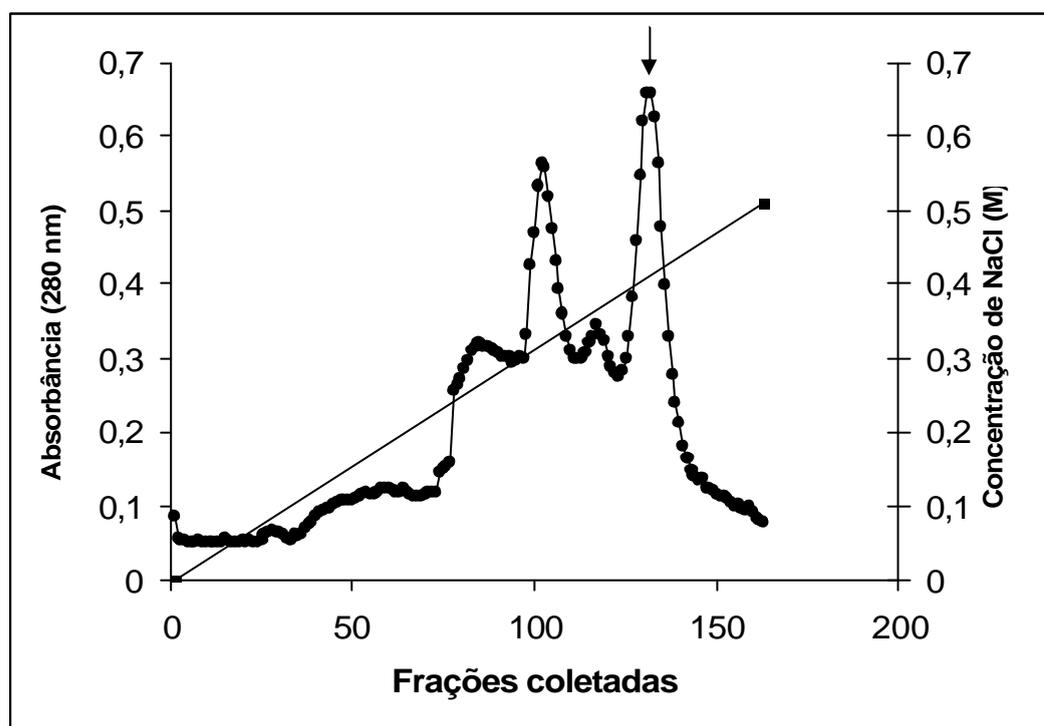
A estabilidade correspondente a 25°C ( $\Delta G^{25}$ ) foi estimada a partir da equação de Gibbs (5), considerando o intervalo de temperatura de desnaturação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Purificação do BTCI

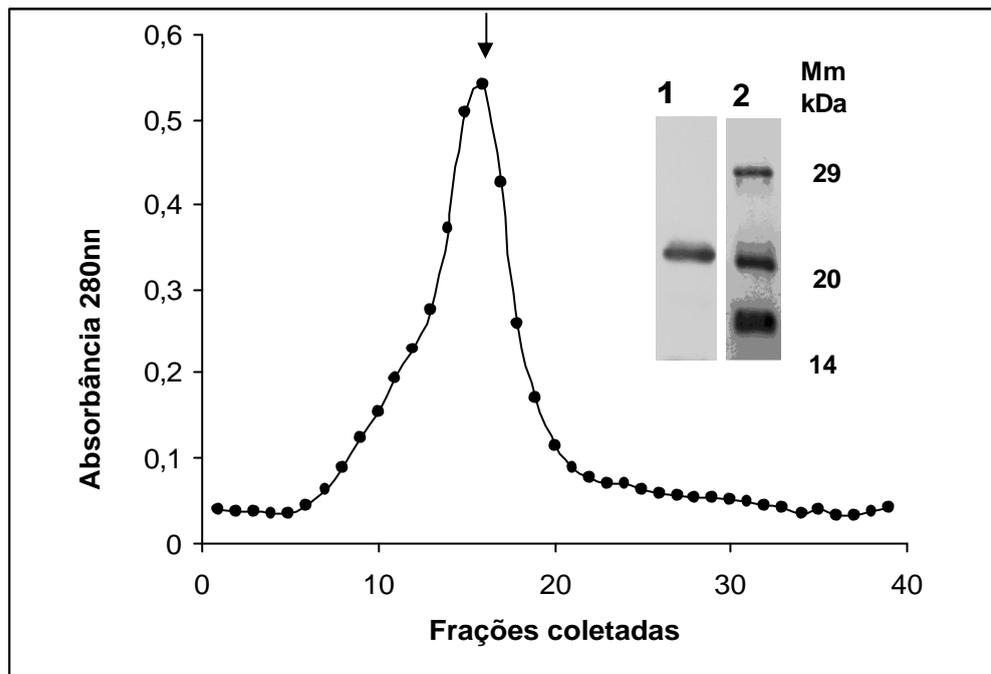
O BTCI foi purificado conforme metodologia descrita por Ventura *et. al.* (1975) por cromatografia de troca iônica (figura 5). As frações consideradas puras pela análise em gel de poliacrilamida 13% foram dialisadas contra água e liofilizadas.



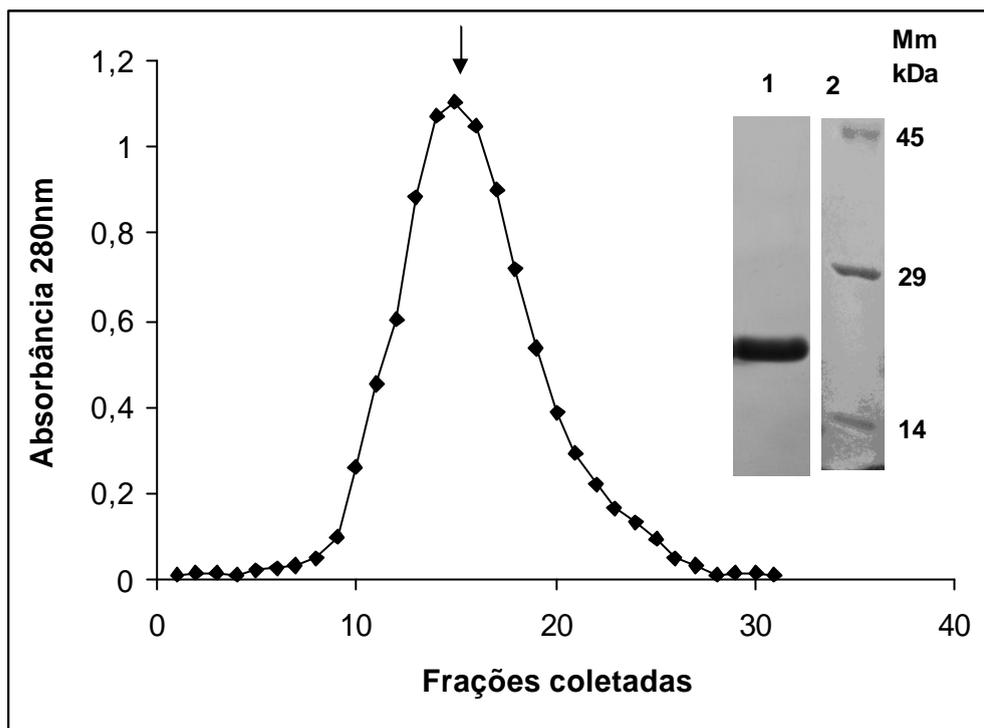
**Figura 5.** Cromatografia de troca iônica indicando a eluição do BTCI.

### 5.2 Purificação dos complexos binários

Os complexos binário (BTCI-quimiotripsina e BTCI-tripsina) foram obtidos pela mistura de BTCI (1 mM) em uma proporção molar de 1:1 com tripsina ou quimiotripsina (1 mM). O complexo purificado foi dialisado contra água e liofilizado.



**Figura 6.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo binário com tripsina do BTCI. A seta indica a eluição do complexo. *Figura inserida:* Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante. Poço 1: complexo binário da  $\beta$ -tripsina com o BTCI (~24 kDa), Poço 2: Marcadores moleculares ( $M_m$ ), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de soja BBI (20kDa), mioglobina (14 kDa).



**Figura 7.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo binário com quimotripsina do BTC1. A seta indica a eluição do complexo. *Figura inserida:* Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante. Poço 1: complexo binário da  $\alpha$ -quimotripsina com o BTC1 (~25kDa); Poço 2: Marcadores moleculares ( $M_m$ ), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (14kDa)

### **5.3 Coleta e processamento de dados da difração de raios-X do complexo binário com tripsina**

A condição utilizada para a coleta dos dados na linha MX1 do LNLS foi 0,1 M HEPES de sódio pH 7,5, 5% (v/v) polietilenoglicol (PEG) 400 e 2,0 M sulfato de amônio. Para a coleta os cristais foram banhados na solução mãe contendo 15% glicerol (v/v) como agente crioprotetor. A indexação e o refinamento desses dados forneceram valores compatíveis com as coordenadas do espaço recíproco pertencentes ao grupo espacial  $P2_12_12_1$  com as medidas de célula unitária com os eixos  $a = 60,50 \text{ \AA}$ ,  $b = 61,11 \text{ \AA}$  e  $c = 79,26 \text{ \AA}$  e os ângulos  $\alpha = \beta = \gamma = 90,00^\circ$ . O primeiro cristal difratou a uma resolução de  $2,36 \text{ \AA}$ , mas o melhor cristal encontrado posteriormente difratou a  $1,55 \text{ \AA}$ . Estes dados estão descritos na tabela 1.

### **5.4 Construção do modelo da estrutura tridimensional do complexo binário com tripsina**

Os dados das 162 imagens geradas a partir da rotação do cristal em  $1,0^\circ$  foram integrados e indexados e resultaram em completeza de 99,5%, baixa mosaicidade e resolução máxima de  $1,55 \text{ \AA}$ , esta resolução encontra-se dentro do intervalo de  $1,5 \text{ \AA}$  a  $3,0 \text{ \AA}$  para a resolução de estruturas tridimensionais. O valor obtido do  $R_{\text{sym}}$  foi de 0,06, que está muito abaixo do limite esperado (valor entre 0 a 5%), indicando que é um conjunto de dados excelente para a resolução do modelo tridimensional (tabela 1).

A estrutura do complexo foi resolvida por substituição molecular usando como molde a estrutura da tripsina em complexo com o inibidor de *Phaseolus angularis* (Tsunogae *et. al.*, 1986). O alinhamento das sequências, obtido pelo programa clustalW2

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) mostrou 80,2% de identidade entre as cadeias (figura 10). Um modelo parcialmente refinado do primeiro conjunto de dados com resolução de 2,36 Å foi utilizado na substituição molecular para o conjunto de 1,55 Å e resultou nos valores de  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  de 0,265 e 0,279, respectivamente. Os resultados detalhados sobre a coleta de dados e o refinamento do modelo são apresentados na tabela 1.

```

1TAB_I| SGHDETTEDEPSESSKPCCDQCSCTKSMPPKCRCSDIRLNSCHSACKSCA
2G81_I| SGHHEDSTDEASESSKPCCDRCECTKSIPQCRCSDVRLNSCHSACKSCA
      *****:***:*****:*.****:*.****:*****:*****
1TAB_I| CTYSIPAKCFCTDINDFCYEPCKSSR--DDDWDN 82
2G81_I| CTFSIPAQCFCGDINDFCYKPKSSHSDDDDWN- 83
      **:****:*** *****:****: ****:

```

**Figura 8.** Alinhamento seqüencial do inibidor de *Phaseolus angularis* (PDB 1TAB cadeia I), com o BTC1 (PDB 2G81, cadeia I).

**Tabela 1.** Coleta de dados do complexo BTCl - Tripsina e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,63 – 1,55° Å.

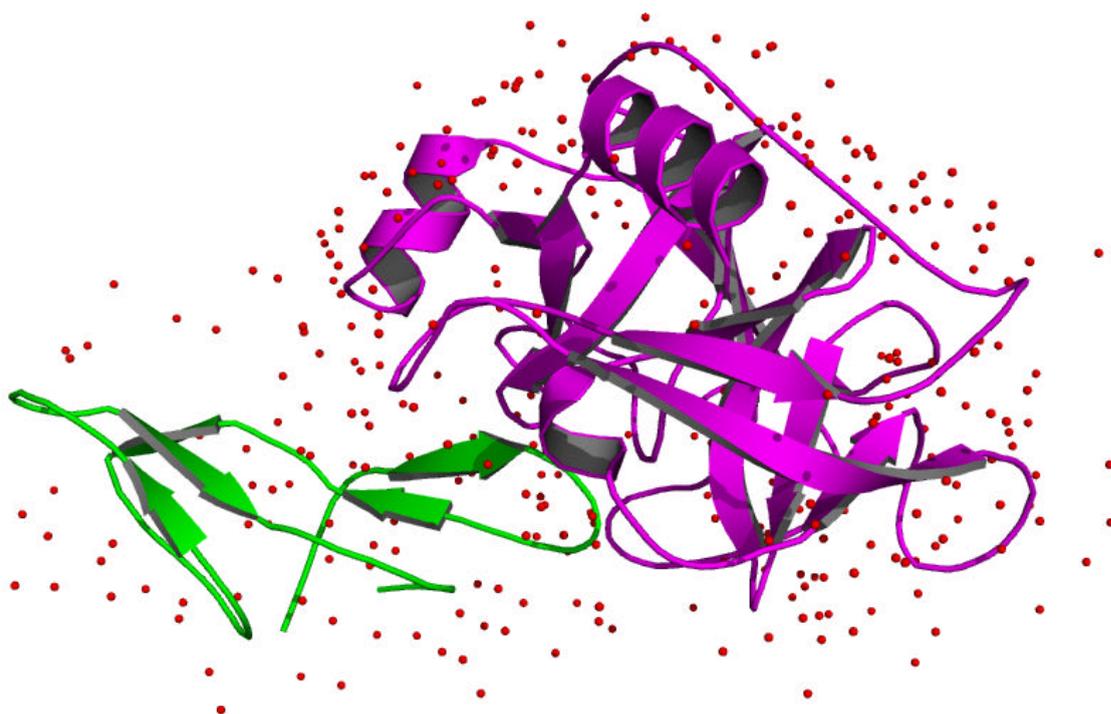
<b>A. Coleta de dados</b>	
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parâmetros da célula (a, b, c) (Å)	a=60,50 ; b=61,11 ; c=79,26
Intervalo de resolução (Å)	40,00 – 1,55 (1,63 1,55)
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,431
Oscilação (°)	1,0
Distância do detector (mm)	57
Número de imagens	162
I/σ(I) depois da fusão	30,5 (4,9)
Completeza (%)	99,5 (98,6)
Multiplicidade	6,3 (5,9)
R <sub>sym</sub> <sup>a</sup>	0,060 (0,353)
Número de reflexões	273490
Número de reflexões únicas	43170 (4216)
<b>B. Estatísticas de refinamento</b>	
Intervalo de resolução (Å)	30,00 – 1,55
Número de reflexões	43111
R <sub>free</sub>	2145
Número de átomos (sem hidrogênio)	2486
Proteína	2102
Água	323
Heteroátomos	61
<b>C. Parâmetros de qualidade do modelo</b>	
Fator R (%) <sup>b</sup>	15,4
R <sub>free</sub> (%)	16,9
Desvios rms da idealidade	
Comprimento das ligações (Å)	0,011
Ângulo das ligações (Å)	1,483
Média do fator de temperatura (Å <sup>2</sup> )	20,53
Proteína	18,12
Solvente	34,61
Heteroátomos	28,38
Plot de Ramachandran	
Regiões mais favorecidas (%)	87,8
Regiões permitidas adicionais (%)	11,8
Regiões geralmente permitidas (%)	0,4
Fator G	0,1

<sup>a</sup>  $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum |I|$ , onde  $\langle I \rangle$  é a intensidade média das reflexões equivalentes.

<sup>b</sup> Fator R =  $\sum ||I_o| - |F_c|| / |F_o|$ .

## 5.5 Análise do modelo da estrutura tridimensional do complexo binário com tripsina

O modelo final da estrutura do complexo binário BTCI-Tripsina, com os heteroátomos e as moléculas de solvente pode ser observado na figura 9 gerada pelo programa Pymol (DeLano, 2005).



**Figura 9.** Modelo da estrutura do complexo BTCI (verde) com a tripsina (magenta) incluindo as águas cristalográficas (vermelho) PDB: 2G81.

O modelo final do complexo inclui os resíduos 17–72 do BTCI, 16–238 da tripsina, 323 moléculas de água, 4 sulfatos, 2 acetatos e 3 moléculas de polietileno glicol (PEG). A qualidade da densidade não permitiu localizar dois segmentos do BTCI (resíduos de 1-16 e 73-83), que fazem parte de uma região flexível no N e C terminal da molécula, como relatado em outras estruturas de inibidores BBI depositadas no PDB (Chen *et. al.*, 1992; Debreczeni *et. al.*, 2003; DeLaSierra *et. al.*, 1999; Werner e Wemmer, 1992).

Todas as moléculas de águas foram observadas e analisadas quanto à estabilização da estrutura tridimensional por ligações de hidrogênio e as distâncias pertinentes entre essas moléculas e as cadeias laterais dos aminoácidos. Este modelo refinado apresentou o fator R de 15,4% (melhor do que o valor regularmente considerado, 20%, para estruturas com alta qualidade e resolução) e o  $R_{\text{free}}$  de 16,9%. O fator R é uma medida da similaridade entre o modelo cristalográfico utilizado e os dados experimentais da difração de raios-X. Essa medida indica o quanto a estrutura refinada a partir dos dados observados no experimento de difração de raios X está de acordo com os dados experimentais (Morris *et. al.*, 1992) e é conferida a cada ciclo de refinamento. Uma porcentagem mínima das reflexões é excluída do refinamento e utilizada como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R, chamado  $R_{\text{free}}$ , que é isento de minimização artificial. Quanto mais próximos os dois fatores, maior a independência do modelo em relação a uma minimização forçada pelos algoritmos utilizados. As coordenadas atômicas foram salvas em um arquivo formato pdb e posteriormente a qualidade do modelo foi avaliado para deposição dos dados no *protein data bank* (PDB)

O gráfico de Ramachandran, calculado para o modelo final com o programa PROCHECK (Laskowski *et. al.*, 1993), mostra que 87,8% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 11,8% em regiões adicionalmente permitidas e 0,4% em regiões geralmente permitidas. A qualidade estereoquímica do modelo também foi analisada durante a deposição dos dados no PDB. Após a avaliação e aprovação dos consultores deste banco de dados, o modelo foi considerado de alta resolução e suas coordenadas atômicas foram depositadas no PDB, com o código de acesso 2G81.

A forma geral da molécula de BTC1 lembra um cilindro alongado. A estrutura do BTC1 é composta de dois subdomínios similares compactos, cada um com 30 resíduos. Cada subdomínio

tem três fitas  $\beta$  formando uma folha  $\beta$  antiparalela. Uma característica do BTCl é a presença de 14 resíduos de cisteína formando sete ligações dissulfeto. Esse padrão de dobramento é conservado na família de inibidores, que é facilmente identificada pelo padrão de cisteínas presentes na seqüência desses inibidores. As diferenças na conformação estão nas regiões que não estão envolvidas no reconhecimento da proteinase (Laskowski e Qasim, 2000; Song *et. al.*, 1999). Cada subdomínio do BTCl contém um sítio reativo capaz de se ligar ao sítio ativo da protease cognata. O sítio reativo é formado por um *loop* conservado ligando duas fitas  $\beta$ .

No *loop* entre as fitas 1 e 2 está o resíduo Lys26, que é o sítio reativo para tripsina, enquanto que o *loop* entre as fitas 4 e 5 contém Phe53, que é o sítio reativo para inibição da quimotripsina. A distância entre os átomos de carbono da cadeia principal entre os dois sítios reativos (32,5 Å) é muito semelhante ao de BBIs na forma livre mostrando que não há grandes mudanças na estrutura quando o inibidor está na forma de complexo. Esta separação permite a inibição duas moléculas de proteinase simultânea e independentemente (DeLaSierra *et. al.*, 1999; Koepke *et. al.*, 2000; Lin *et. al.*, 1993; Park *et. al.*, 2004; Song *et. al.*, 1999).

Para analisar a flexibilidade do *loop* que contém o sítio reativo no BTCl, uma comparação foi feita entre a média do fator-B (tabela 2) para os resíduos do BTCl e de alguns dos inibidores de estrutura conhecida. O fator B é uma medida que reflete a flutuação dos átomos em torno da sua posição média e fornece informações importantes sobre o movimento atômico (Yuan *et. al.*, 2005). A média dos fatores de temperatura de uma região é um indicativo da sua rigidez e flexibilidade. O BTCl exibe valores relativamente baixos do fator-B (20,53 Å<sup>2</sup>). O fator B do sítio reativo para tripsina (resíduos 24 a 32) (12,56 Å<sup>2</sup>), em complexo, é muito inferior quando comparado com o valor obtido para a quimotripsina (resíduos 51 a

59)(29,07 Å<sup>2</sup>), no estado livre, indicando que a flexibilidade do inibidor pode ser reduzida quando ocorre a formação do complexo. O baixo valor do fator B em torno da interface tripsina-BTCI é devido ao envolvimento de resíduos de aminoácidos em vários contatos polares com a molécula de tripsina (tabela 3), que estabilizam a conformação da estrutura do complexo e sua interface.

**Tabela 2.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCI em complexo com a Tripsina

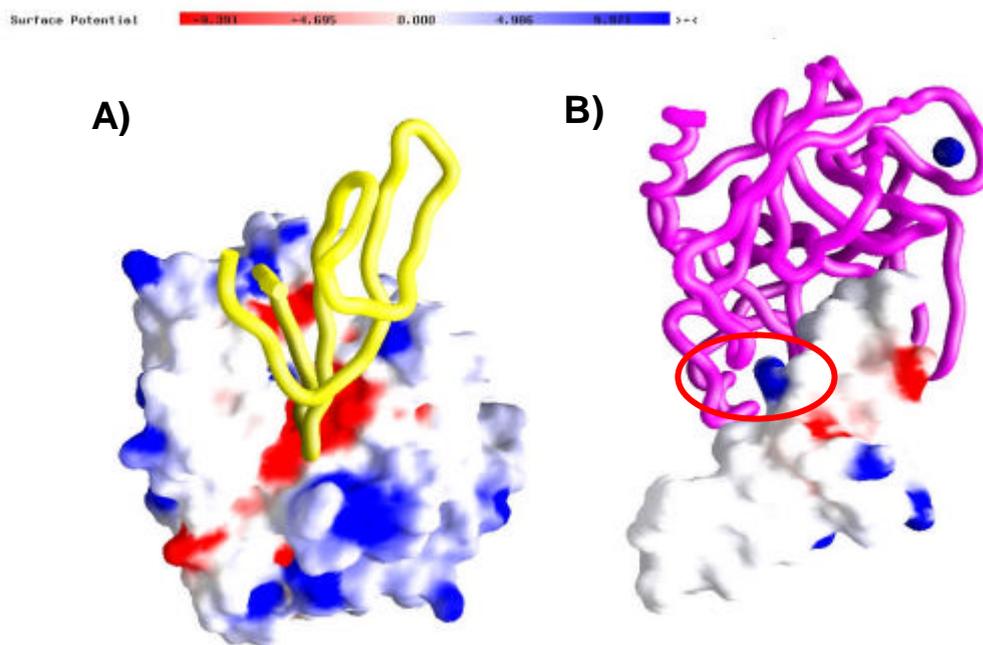
Região	Média do fator de temperatura (Å <sup>2</sup> )
BTCI	20,53
Sítio da tripsina	12,56
Sítio da quimotripsina	29,07

No cristal, o BTCI se liga a uma molécula de tripsina, impulsionado principalmente por forças eletrostáticas com a participação de duas moléculas de água (figura 11, em vermelho). A tripsina liga ao BTCI, inicialmente, pela Lys26 - o resíduo P1 (figura 11), embora muitos outros resíduos que estão na interface participem do processo (tabela 3).

O carbono alfa equivalente dos átomos de tripsina do complexo apresenta RMSD de 0,47 Å quando comparado com o modelo inicial de tripsina (PDB:1TAB - Tsunogae *et. al.*, 1986), mostrando que a estrutura das enzimas em ambos os complexos estão estreitamente relacionadas sem alterações na estrutura após a complexação.

**Tabela 3.** Contatos polares entre o BTCl, a tripsina e águas selecionadas

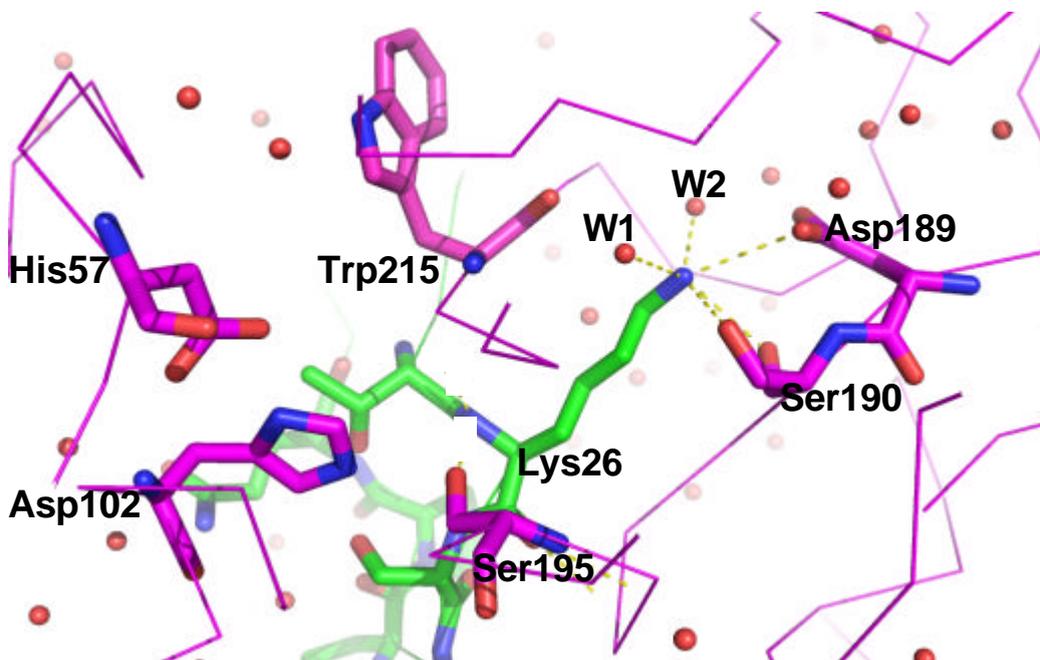
<b>BTCl</b>	<b>Tripsina</b>	<b>Águas</b>
<b>P5</b> Cys22: O	Ser217:OG	
Cys22:O		W132
Cys22:NH		W123
<b>P4</b> Glu23:OE1	Gln175:OE1	
Glu23:OE2		W83
Glu23:OE2		W73
<b>P3</b> Cys24:NH	Gly216:O	
Cys24:O	Gly216:NH	
<b>P1</b> Lys26:NH	Ser214:O	
Lys26:NH	Ser195:OG	
Lys26:O	Gly193:NH	
Lys26:O	Ser195:NH	
Lys26:O	Ser190:OG	
Lys26:NZ	Ser190:O	
Lys26:NZ	Ser190:OG	
Lys26:NZ	Asp189:OD2	
Lys26:NZ		W2
Lys26:NZ		W3
Gly219:O		W3
Asp189:OD1		W3
<b>P1'</b> Ser27:NH	Ser195:OG	
Ser27:OG		W95
<b>P2'</b> Ile28:NH	Phe41:O	
Ile28:O	Lys60:NZ	
Ile28:O		W322
<b>P3'</b> Pro29:O		W95
<b>P4'</b> Pro30:O		W88
<b>P5'</b> Gln31:NE2		W95
Gln31:NE2		W116
<b>P7'</b> Arg33:NH1	Ser96:O	
Arg33:NH2	Asn97:O	
Arg33:NE		W103



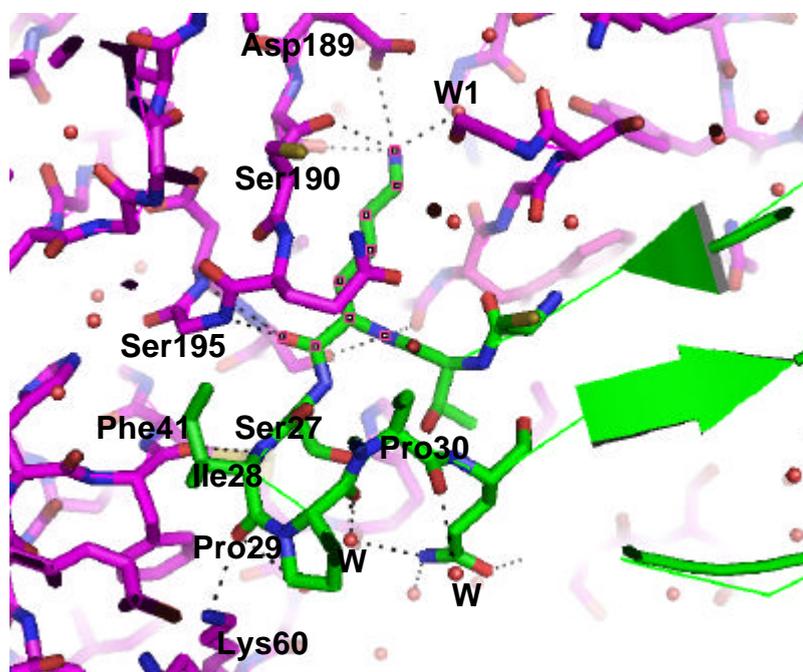
**Figura 10.** Potencial eletrostático da superfície da tripsina e do BTCI. **A)** Superfície da tripsina evidenciando a carga negativa do bolsão catalítico, representação em tubo (*ribbon*) da cadeia principal do BTCI em amarelo. **B)** Superfície do BTCI evidenciando a carga positiva da Lisina 26, representação em tubo (*ribbon*) da cadeia principal da tripsina em magenta.

A conformação deste sítio reativo é mantida por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo P2 e P9, (figura 12) expondo a cadeia lateral de P1 para a interação inicial com a tripsina (Lin *et. al.*, 1993; Voss *et. al.*, 1996; Song *et. al.*, 1999). A carga positiva no grupo amino na extremidade da Lys26 é estabilizada principalmente pela cadeia lateral carregada negativamente de Asp189 que é o resíduo S1 do bolsão catalítico da tripsina, mediado por duas moléculas de água .

A cadeia da lisina na sua conformação estendida complementa o bolsão S1 da enzima. Outros contatos polares importantes ocorrem entre as moléculas de água W1 e W2 que interagem diretamente com o grupo amino do resíduo P1.



**Figura 11.** Interação entre o BTCL (verde) Lys26 e a tripsina (magenta) Asp189 e Ser190 coordenado pelas moléculas de água W1 e W2. Os resíduos da tríade catalítica da enzima (His57, Asp102, Ser195) e o triptofano 215 estão evidenciados.



**Figura 12.** Interação entre o BTCL (verde) região P2 a P9 e a tripsina (magenta) mostrando algumas das pontes de hidrogênio (preto).

Os resíduos altamente conservados no *loop* reativo são fundamentais para a manutenção da conformação e atividade do inibidor. A rigidez estrutural dos BBIs tem sido extensivamente descritas e resultou inicialmente na hipótese de que esses inibidores não alteram a sua estrutura após a complexação com as enzimas (Bode e Huber, 1992; Murthy *et. al.*, 2000). No entanto, foi demonstrado que durante a interação da enzima pequenas mudanças conformacionais podem ocorrer (Bolognesi *et. al.*, 1982). De La Sierra *et. al.*, (1999) propuseram que uma mobilidade dos *loops* reativos 1 e 2, em relação um ao outro, é necessária para o ajuste preciso das duas enzimas ao inibidor.

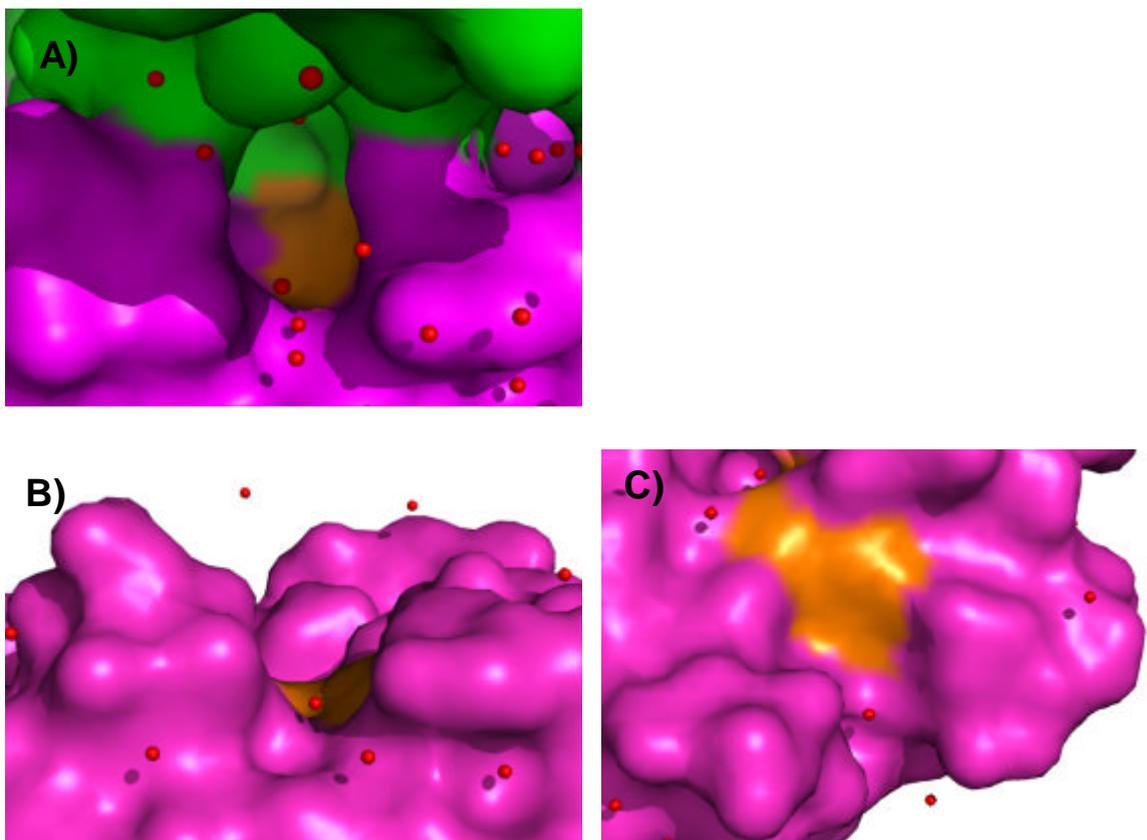
Além disso, Catalano *et. al.* (2003) mostraram que a falta de ligação dissulfeto entre os dois subdomínios permite a flexibilidade e orientação estereoquímica desses subdomínios em relação um a outro, confirmando a importância da mobilidade entre os *loops* reativos. Todas as ligações dissulfeto ocorrem dentro de um mesmo domínio, ou entre o resíduo de um domínio e um resíduo na borda do mesmo domínio. Estas observações são enfatizadas considerando a dupla funcionalidade característica deste inibidor, que exige mobilidade de um domínio em relação ao outro para o seu ajuste preciso durante a inibição simultânea de duas enzimas.

Esses dados são consistentes com dados anteriores que mostram que cada domínio perde a sua estabilidade e parte da atividade inibitória quando as conexões entre os domínios são removidas. Essa diminuição da atividade inibitória é maior para o domínio 2 (quimotripsina) do que para o domínio 1 (tripsina), indicando maior sensibilidade por parte do sítio antiquimotriptico em relação a esses movimentos moleculares (Odani e Ikenaka, 1978; Ikenaka e Norioka, 1986). Koepke *et. al.*, 2000 demonstraram que no complexo ternário entre BBI de soja e duas moléculas de tripsina a conformação de cadeias laterais pode mudar drasticamente no sítio

reativo responsável pela inibição de quimotripsina. Neste caso, o sítio adicional para ligação de tripsina está localizado no domínio do sítio reativo de quimotripsina. Essas mudanças são discutidas quanto à capacidade de ligação com menor afinidade de enzimas quimotripsina-*like* no sítio reativo correspondente a interação com a quimotripsina em outros inibidores.

Apesar de não estar claro se o sítio reativo mudaria se ligado ao seu alvo específico (quimotripsina), mudanças conformacionais podem ocorrer. Isto levou à sugestão de que a predominância de contatos hidrofílicos e à rigidez conformacional do sítio reativo são responsáveis pela alta especificidade para a tripsina, enquanto a alta hidrofobicidade e mobilidade conformacional do domínio anti-quimotriptico conferem um amplo espectro de inibição e a tendência de auto-associação desses inibidores. Além disso, em uma maior concentração do inibidor, o domínio reativo do BBI de soja é impedido de interagir com a tripsina por auto-associação com seu sítio inibidor de quimotripsina (Werner e Wemmer, 1992).

Conforme estudos anteriores, a interação BTCl-enzima é acompanhada por mudanças no ambiente de cromóforos das moléculas que formam o complexo (Morhy e Ventura, 1998). A interação entre o BTCl e a tripsina resulta no enterramento equivalente a aproximadamente um grupo triptofil. A estrutura cristalográfica do complexo BTCl-tripsina mostra que o único resíduo de triptofil que ficou parcialmente enterrado na interface do complexo é o Trp215 da enzima. Conforme mostrado na comparação das estruturas BTCl e tripsina (figura 13), o triptofano 215 da enzima em estado livre apresenta grande área acessível ao solvente. O BTCl ao interagir com a tripsina encaixa na enzima acima da região onde está o triptofano 215 da enzima (figura 13 – C). Por conseqüência, esse triptofano fica parcialmente enterrado e o acesso ao solvente passa a ocorrer apenas através de uma fenda na região lateral do complexo.

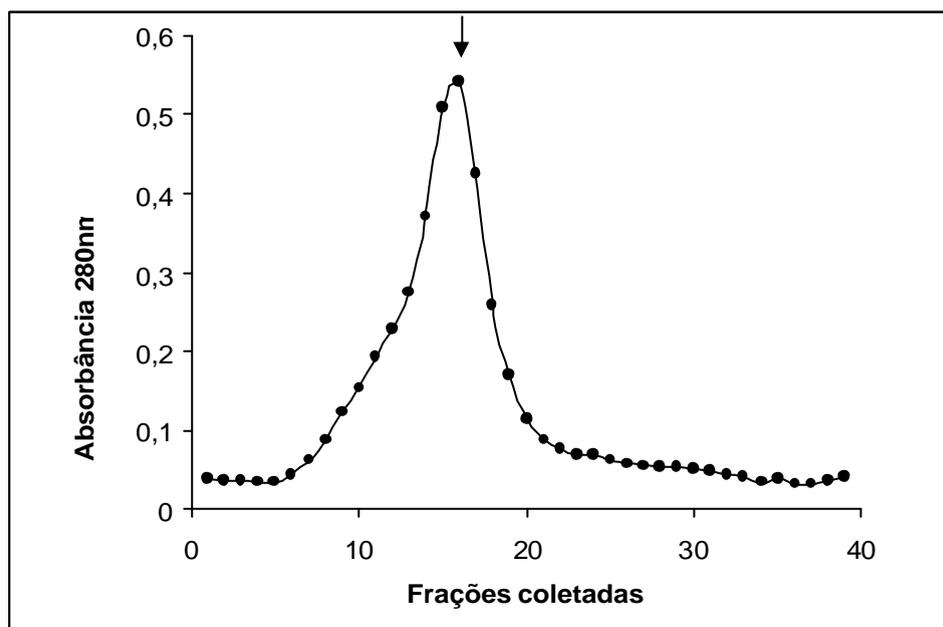


**Figura 13.** **A)** Região de interface do complexo BTCl-tripsina mostrando a superfície do triptofano 215 da tripsina (visão lateral em magenta) e o BTCl em verde. **B)** Superfície do triptofano 215 (visão lateral) da tripsina livre (magenta). **C)** Superfície do triptofano 215 (visão superior) da tripsina livre (magenta).

Estes resultados mostram que BBIs apresentam sítios reativos independentes e as mudanças conformacionais na formação de complexos binários e ternários ocorrem principalmente na região da interface dos complexos, sendo que a enzima sofre maiores alterações do que o inibidor estudado.

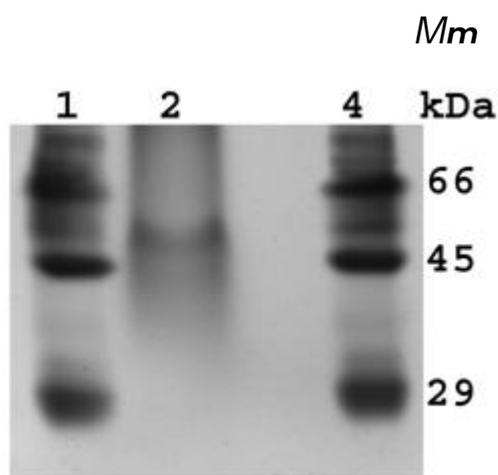
## 5. 6 Obtenção e purificação do complexo ternário

O BTCI foi purificado de sementes de *V. unguiculata* conforme relatado anteriormente (Ventura e Filho, 1966). O complexo ternário (quimiotripsina-BTCI-tripsina) foi obtido pela mistura BTCI (1 mM) com uma proporção molar de 1:1 com tripsina em solução tampão 0,05 M Tris-HCl, 0,2 M KCl pH 7,5 por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a  $\alpha$ -quimotripsina foi adicionada na mesma proporção molar e esta solução incubada por mais 30 minutos no mesmo tampão. O complexo ternário resultante foi purificado a partir dessa mistura por cromatografia de exclusão molecular (Ventura *et. al.*, 1975, Fachetti *et. al.*, 1984) e o cromatograma está apresentado na figura 14.



**Figura 14.** Cromatografia de exclusão molecular do complexo ternário do BTCI em Sephadex G-75 de 75 cm, fluxo de 25 mL/h. A seta indica a eluição do complexo ternário.

A pureza do complexo foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições não desnaturantes. O complexo corresponde a banda de aproximadamente 55 kDa no gel (. 15).



**Figura 15.** Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante. Poço 1 e 4: marcadores moleculares ( $M_m$ ), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa). Poço 2: complexo ternário do BTC1 (~55 kDa).

### 5.7 Coleta e processamento de dados da difração de raios X do complexo ternário

Foram obtidos cristais em diversas condições, mas somente duas em dois pHs diferentes foram escolhidas para a resolução e refinamento, sendo o primeiro em 0,1 M de HEPES de sódio pH 7,5 e 0,5 M de sulfato de amônia e o segundo em 2-metil 2,4-pentanodiol (MPD) 30%, 0,1 M de acetato de sódio pH 4,5, 0,1 M de cloreto de cobalto hidratado e 1M de hexanodiol. A coleta de dados dos cristais foi realizada na linha de cristalografia de proteínas MX1 do LNLS.

Esses dados foram indexados e refinados resultando em valores compatíveis com as coordenadas do espaço recíproco pertencentes ao grupo espacial  $P_1$  com as medidas de célula unitária com os eixos  $a=49,48$ ;  $b=54,57$ ;  $c=69,29$  (Å); e os ângulos  $\alpha=67,28$ ;  $\beta=71,04$ ;  $\gamma=73,55$  ( $^\circ$ ) para o cristal obtido em pH 7,5. Para o cristal obtido em pH 4,5 o grupo espacial foi  $P_1$  com as medidas de célula unitária com os eixos  $a=48,96$ ;  $b=54,37$ ;  $c=68,40$  (Å); e os ângulos  $\alpha=67,93$ ;

$\beta=72,00$ ;  $\gamma=74,10$  ( $^{\circ}$ ). Os dados da coleta e do refinamento nas duas condições estão mostrados nas tabelas 4 e 5.

## **5.8 Construção do modelo da estrutura tridimensional do complexo ternário**

Os dados das imagens geradas a partir da rotação do cristal em  $1,0^{\circ}$  foram integrados e indexados e resultaram em valores de alta completude, baixa mosaicidade e resolução de 1,70 e 1,63 Å, para o cristal em pH 7,5 e 4,5 respectivamente. Estes valores encontram-se dentro do intervalo de estruturas resolvidas em alta resolução, sendo a única estrutura de inibidor Bowman-Birk em complexo ternário com diferentes enzimas (quimotripsina e tripsina) reportadas até o presente momento. Os resultados detalhados sobre a coleta de dados e o refinamento do modelo são apresentados nas tabelas 4 e 5.

A resolução da estrutura foi realizada pelo método de substituição molecular (vide métodos) utilizando as coordenadas do complexo BTCl-tripsina (código pdb 2G81; Barbosa *et. al*, 2007) e da quimotripsina (código pdb 4CHA – Tsukada *et. al*, 1985). Durante o processo de substituição molecular foi testada a possibilidade de o complexo ternário ser formado por 2 cópias de tripsina ou de 2 cópias de quimotripsina. Nestes dois casos testados não foi encontrada nenhuma solução por substituição molecular. Além disso, a densidade eletrônica mostrava claramente as cadeias laterais dos aminoácidos correspondentes às sequências das duas proteases e não de duas cópias de uma única. Dessa forma, foi confirmado que o complexo ternário é efetivamente formado por uma molécula de quimotripsina e outra de tripsina.

**Tabela 4.** Coleta de dados do complexo ternário em pH 7,5 e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,96 – 1,70 Å.

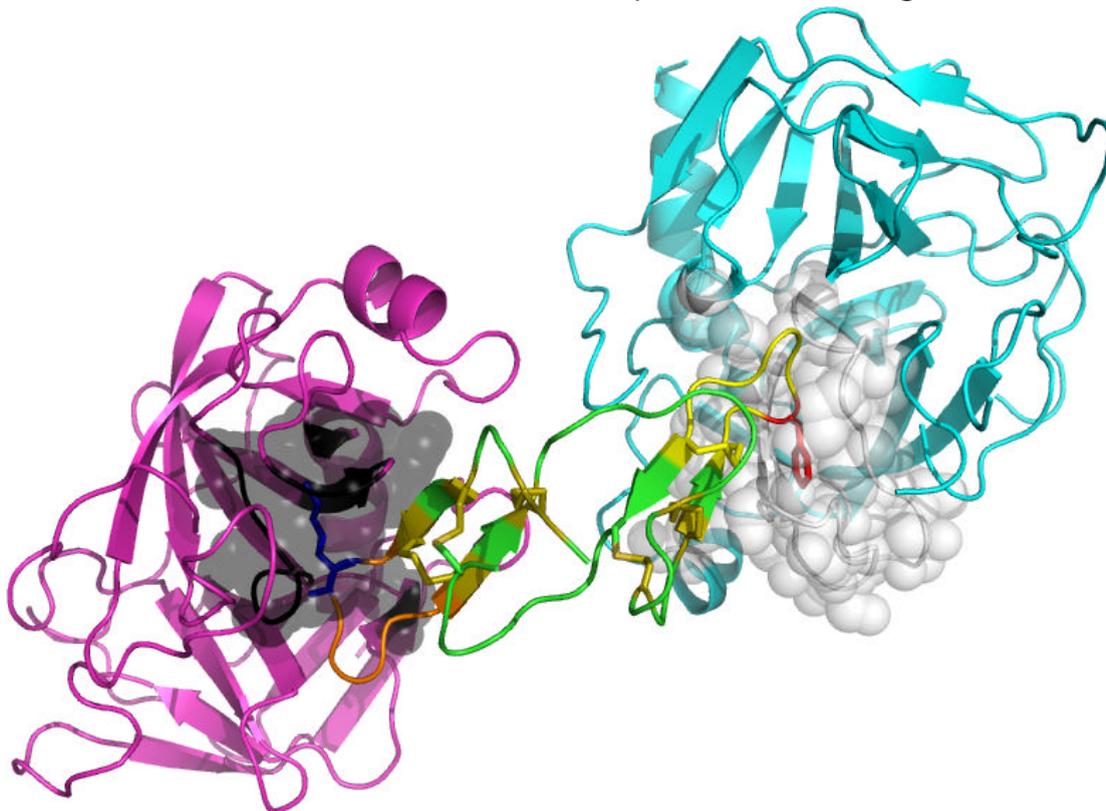
<b>A. Coleta de dados</b>	
Grupo espacial	P1
Parâmetros da célula (a, b, c) (Å)	a=49,48; b=54,57; c=69,29 (Å); $\alpha=67,28$ ; $\beta=71,04$ ; $\gamma=73,55$
Intervalo de resolução (Å)	19,60 – 1,70 (1,74 - 1,70)
Mosaicidade	0,6
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,431
Oscilação (°)	1,0
Distância do detector (mm)	67
Número de imagens	200
I/ $\sigma$ (I) depois da fusão	11,87 (1,28)
Completeza (%)	80,6 (27,2)
Multiplicidade	2,0 (1,2)
$R_{\text{sym}}^a$	0,099 (0,370)
Número de reflexões	117085
Número de reflexões únicas	57400 (1950)
<b>B. Estatísticas de refinamento</b>	
Intervalo de resolução (Å)	27,00 – 1,70
Número de reflexões	57001
$R_{\text{free}}$	2972
Número de átomos (sem hidrogênio)	4651
Proteína	3892
Água	723
Heteroátomos	36
<b>C. Parâmetros de qualidade do modelo</b>	
Fator R (%) <sup>b</sup>	17,1
$R_{\text{free}}$ (%)	21,8
Plot de Ramachandran	
Regiões mais favorecidas (%)	87,9
Regiões permitidas adicionais (%)	11,2
Regiões geralmente permitidas (%)	0,9
<sup>a</sup> $R_{\text{sym}} = \sum  I - \langle I \rangle  / \sum  I $ , onde $\langle I \rangle$ é a intensidade média das reflexões equivalentes.	
<sup>b</sup> Fator R = $\sum   F_o  -  F_c   /  F_o $ .	

**Tabela 5.** Coleta de dados do complexo ternário em pH 4,5 e estatísticas de refinamento. Os valores entre parênteses correspondem aos dados relativos à última camada de resolução de 1,69 – 1,63 Å.

<b>A. Coleta de dados</b>	
Grupo espacial	P1
Parâmetros da célula (a, b, c) (Å)	a=48,96; b=54,37; c=68,40 (Å); $\alpha=67,93$ ; $\beta=72,00$ ; $\gamma=74,10$
Intervalo de resolução (Å)	15,00 – 1,63 (1,69 - 1,63)
Mosaicidade	0,8
Temperatura (K)	100
Comprimento de onda (Å)	1,431
Oscilação (°)	1,0
Distância do detector (mm)	65
Número de imagens	410
I/ $\sigma$ (I) depois da fusão	28,14 (2,58)
Completeza (%)	92,4 (83,7)
Multiplicidade	4,4 (4,2)
$R_{\text{sym}}^a$	0,076 (0,538)
Número de reflexões	309267
Número de reflexões únicas	70679 (6439)
<b>B. Estatísticas de refinamento</b>	
Intervalo de resolução (Å)	14,88 – 1,63
Número de reflexões	67104
$R_{\text{free}}$	3392
Número de átomos (sem hidrogênio)	4473
Proteína	3941
Água	475
Heteroátomos	59
<b>C. Parâmetros de qualidade do modelo</b>	
Fator R (%) <sup>b</sup>	16,8
$R_{\text{free}}$ (%)	19,2
Plot de Ramachandran	88,4
Regiões mais favorecidas (%)	11,3
Regiões permitidas adicionais (%)	0,2
Regiões geralmente permitidas (%)	0,2
<sup>a</sup> $R_{\text{sym}} = S \sum  I - \langle I \rangle  / S \sum  I $ , onde $\langle I \rangle$ é a intensidade média das reflexões equivalentes.	
<sup>b</sup> Fator R = $S \sum   F_o  -  F_c   /  F_o $ .	

O refinamento inicial foi feito por *simulated annealing* com o programa CNS (Brunger *et. al*, 1998) e posteriormente com o programa REFMAC (Murshudov *et. al*, 1999) (Pacote CCP4i) seguido de ciclos análise da geometria e mapas de densidade utilizando o programa *WinCoot* (Emsley e Cowtan, 2004).

A cada ciclo de refinamento o  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  apresentaram valores cada vez mais baixos e aproximados, indicando a qualidade do modelo obtido. Esses valores foram ainda reduzidos (Tabela 4 e 5) quando foram adicionadas as águas, utilizando o programa ARP/wARP (Perrakis *et. al*, 1999), e os heteroátomos, seguido de mais ciclos de refinamentos intercalados com ajustes no programa *WinCoot* (Emsley e Cowtan, 2004). O modelo final está apresentado na figura 16.



**Figura 16.** BTCl (verde) em complexo ternário com a tripsina (rosa – bolsão em preto) e a quimotripsina (ciano – bolsão em cinza) em pH 7,5. Os sítios reativos do BTCl estão mostrados em laranja (tripsina) e amarelo (quimotripsina). Os resíduos P1 do BTCl estão destacados em azul (lisina 26) e vermelho (fenilalanina 52). Em oliva estão as ligações dissulfeto do inibidor.

O modelo final da estrutura do complexo ternário tripsina-BTCI-quimotripsina em pH 7,5 foi obtido após 28 ciclos de refinamento, seguido de análise da estrutura tridimensional associada ao mapa de densidade eletrônica (figura 16). O modelo final do complexo inclui o BTCI, a tripsina, a quimotripsina, além de moléculas de água, de polietilenoglicol, de glicerol, de sulfatos e de 2-metil 2,4-pentanodiol (MPD).

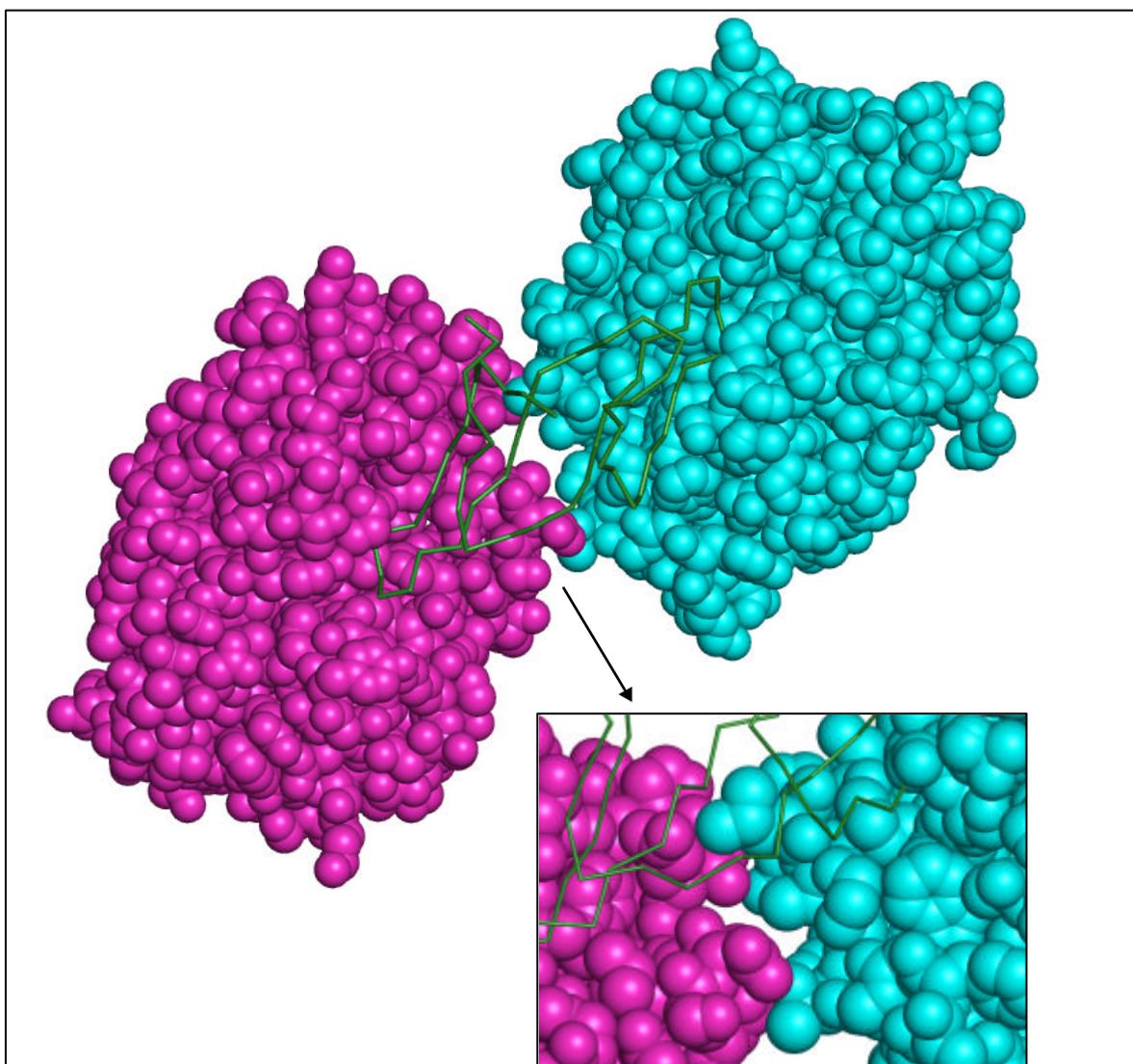
Todas as moléculas de águas foram observadas e analisadas quanto à estabilização da estrutura tridimensional por ligações de hidrogênio e as distâncias pertinentes entre essas moléculas e as cadeias laterais dos aminoácidos. Este modelo refinado apresentou resolução máxima de 1,7 Å, Fator R de 17,1% e um  $R_{\text{free}}$  de 21,8%. As coordenadas atômicas foram salvas em um arquivo formato pdb. O gráfico de Ramachandran, calculado para o modelo final com o programa PROCHECK mostra que 87,9% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 11,2% em regiões adicionalmente permitidas e 0,9% em regiões geralmente permitidas.

O melhor modelo estrutural para o pH 4,5 foi obtido após 22 ciclos de refinamento seguido da análise da estrutura tridimensional associada ao mapa de densidade eletrônica, e inclui os resíduos do BTCI, da tripsina, da quimotripsina, moléculas de água, um íon de cálcio, sulfatos e moléculas de MPD. Este modelo refinado apresentou resolução máxima de 1,63 Å, fator R de 16,8% e um  $R_{\text{free}}$  de 19,2%. As coordenadas atômicas foram salvas em um arquivo formato pdb.

O gráfico de Ramachandran, calculado para o modelo final com o programa PROCHECK mostra que 88,4% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis, 11,3% em regiões adicionalmente permitidas e 0,2% em regiões geralmente permitidas.

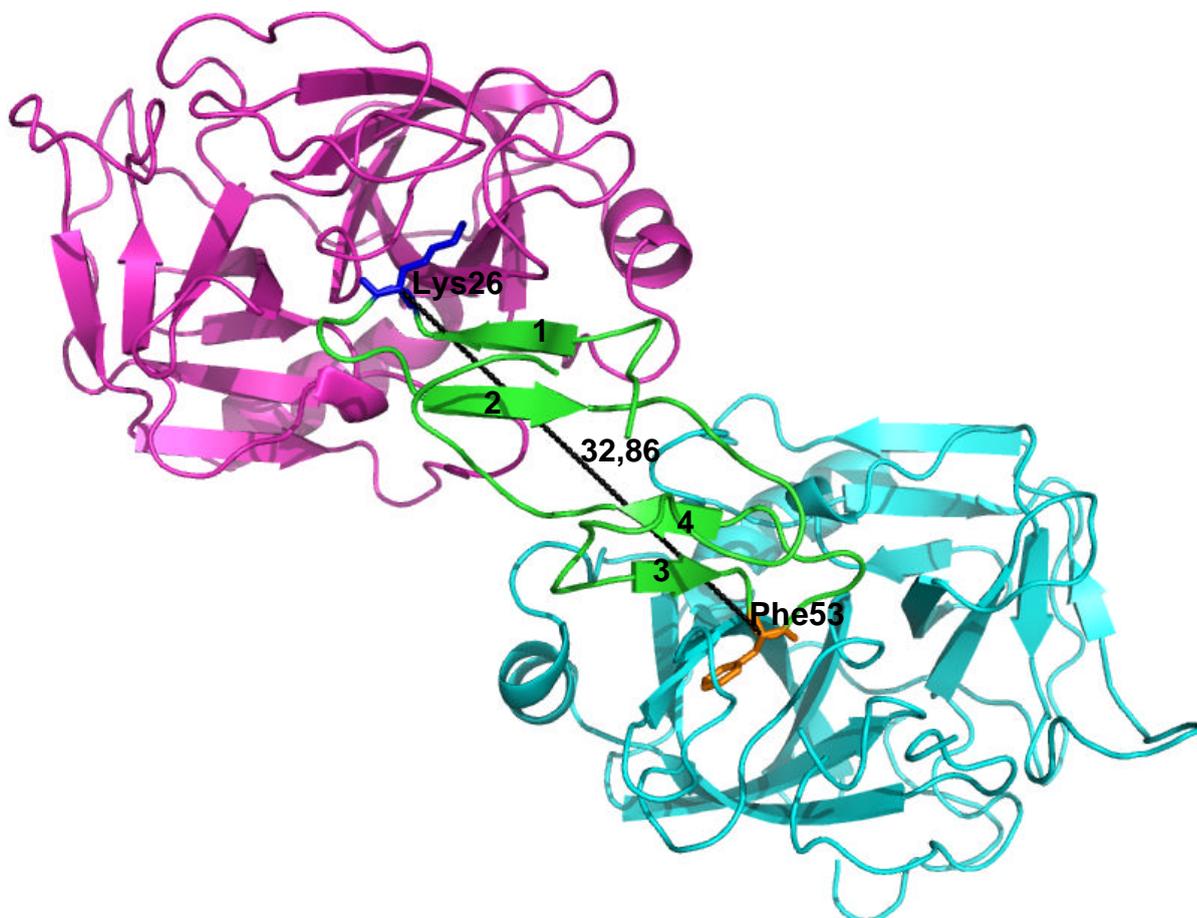
## 5.9 Análise do modelo da estrutura tridimensional do complexo ternário

No modelo do complexo ternário os dois sítios reativos do inibidor estão complexados com suas enzimas correspondentes e nenhum choque estereoquímico foi encontrado entre as enzimas (figura 17).



**Figura 17.** Átomos do complexo ternário do BTCI (verde - traço) com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. O detalhe mostra a região entre as duas enzimas.

Cada subdomínio do BTCI contém um sítio reativo específico para cada protease cognata. No *loop* entre as fitas 1 e 2 está o resíduo lisina 26, que é o resíduo P1 do sítio reativo para tripsina, enquanto que o *loop* entre as fitas 4 e 5 contém a fenilalanina 53, que é o resíduo P1 do sítio reativo para inibição da quimotripsina (figura 18). A distância entre os átomos de carbono da cadeia principal entre os resíduos P1 dos dois sítios reativos em pH 7,5 é de 32,86 Å, e em pH 4,5 é de 33,44 Å (figura 18). Este valor é semelhante ao valor encontrado em complexo binário (32,59 Å) e próximo do valor encontrado para outros membros dessa família, na forma livre: para o BBI de soja o valor foi de 32,37 Å (Werner e Wemmer, 1992) e para o inibidor de arroz 32,80 Å (Lin *et. al*, 2006).



**Figura 18.** BTCI (verde- fitas- $\beta$  numeradas) em complexo com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. Em preto a distância entre a Lisina 26 (azul) e Fenilalanina 53 (laranja).

Para analisar a flexibilidade do *loop* que contém os sítios reativos no BTCl, a comparação entre a média do fator B (fator de temperatura) para os resíduos do BTCl em complexo ternário foi realizada. O fator B é uma medida que reflete a flutuação dos átomos em torno da sua posição média e fornece informações importantes sobre o movimento atômico (Yuan *et. al.*, 2005). A média dos fatores de temperatura de uma região permite avaliar se ela é rígida ou flexível.

O BTCl em complexo ternário em pH 7,5 exibe fator B de 18,20 Å<sup>2</sup>, e em pH 4,5, 21,48 Å<sup>2</sup>. Esses valores são semelhantes ao valor de 20,53 Å<sup>2</sup> encontrado para o complexo binário com a tripsina. Essas diferenças encontradas mostram pequenas variações estruturais que podem ser consequência da ação do pH alterando a carga e algumas ligações não covalentes no BTCl em decorrência da mudança de cargas no meio.

O fator B do sítio reativo para tripsina (resíduos 25-31) foi de 15,07 Å<sup>2</sup> no pH 7,5 e 18,36 no pH 4,5. Esse valor é superior ao valor obtido para a quimotripsina (resíduos 52-58) - 13,23 Å<sup>2</sup> em pH 7,5 e 16,71 em pH 4,5. Estes valores baixos (menor que 20 Å<sup>2</sup>) indicam que, em ambos os sítios, a posição dos átomos foi determinada com precisão, além de serem indicativos que há pouca movimentação atômica. Os fatores B dos sítios reativos para quimotripsina em complexo são muito inferiores (tabela 6 e 7) quando comparados com o valor obtido para a quimotripsina no estado livre (29,07 Å<sup>2</sup>), indicando claramente que a flexibilidade do sítio reativo do inibidor pode ser reduzida quando ocorre a ligação da enzima ao sítio reativo do inibidor.

**Tabela 6.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCI em complexo ternário em pH 7,5.

<b>Região</b>	<b>Média do fator de temperatura (Å<sup>2</sup>)</b>
BTCI	18,20
Sítio da tripsina	15,07
Sítio da quimotripsina	13,23

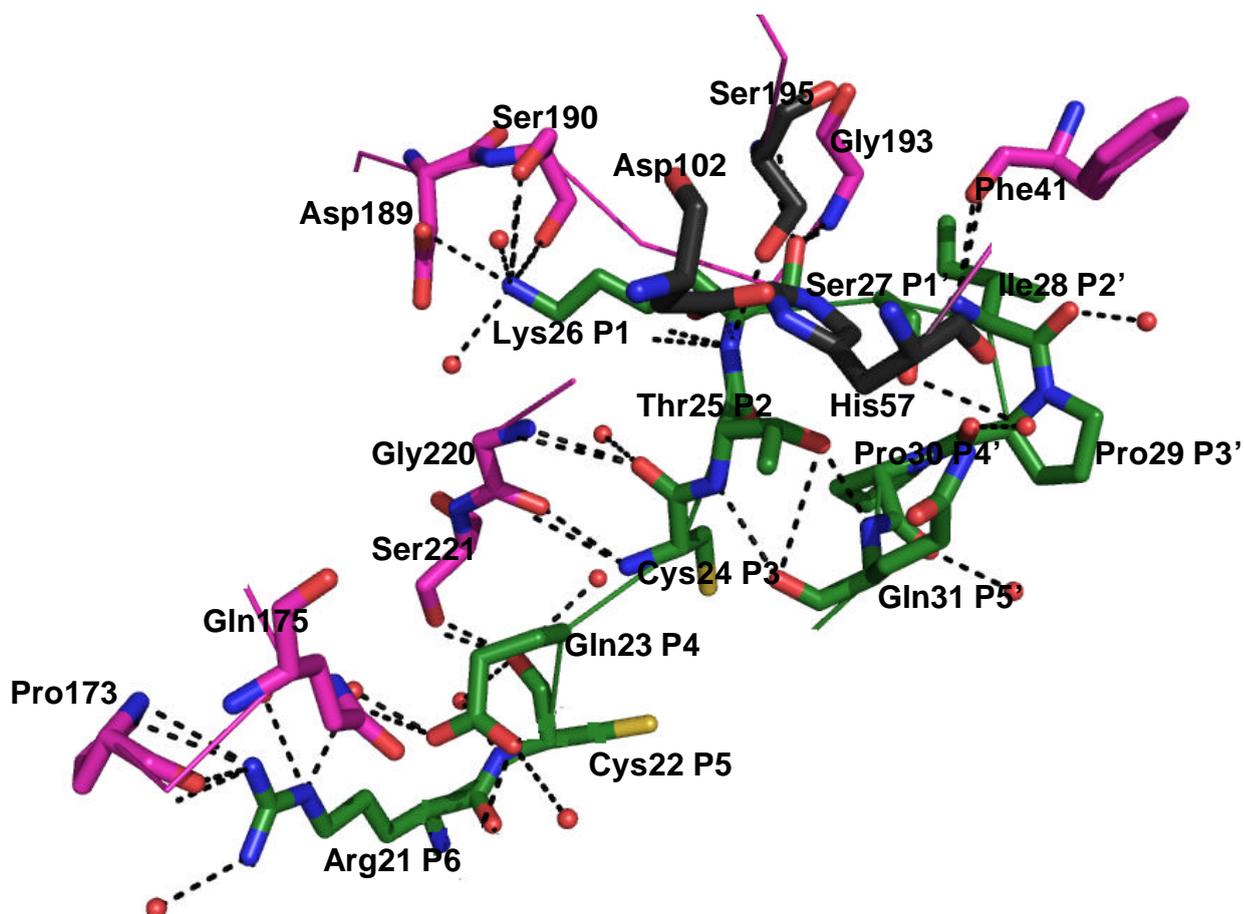
**Tabela 7.** Valor médio dos fatores de temperatura do BTCI em complexo ternário em pH 4,5.

<b>Região</b>	<b>Média do fator de temperatura (Å<sup>2</sup>)</b>
BTCI	21,48
Sítio da tripsina	18,36
Sítio da quimotripsina	16,71

### **5.9 Análise da região de interface da tripsina**

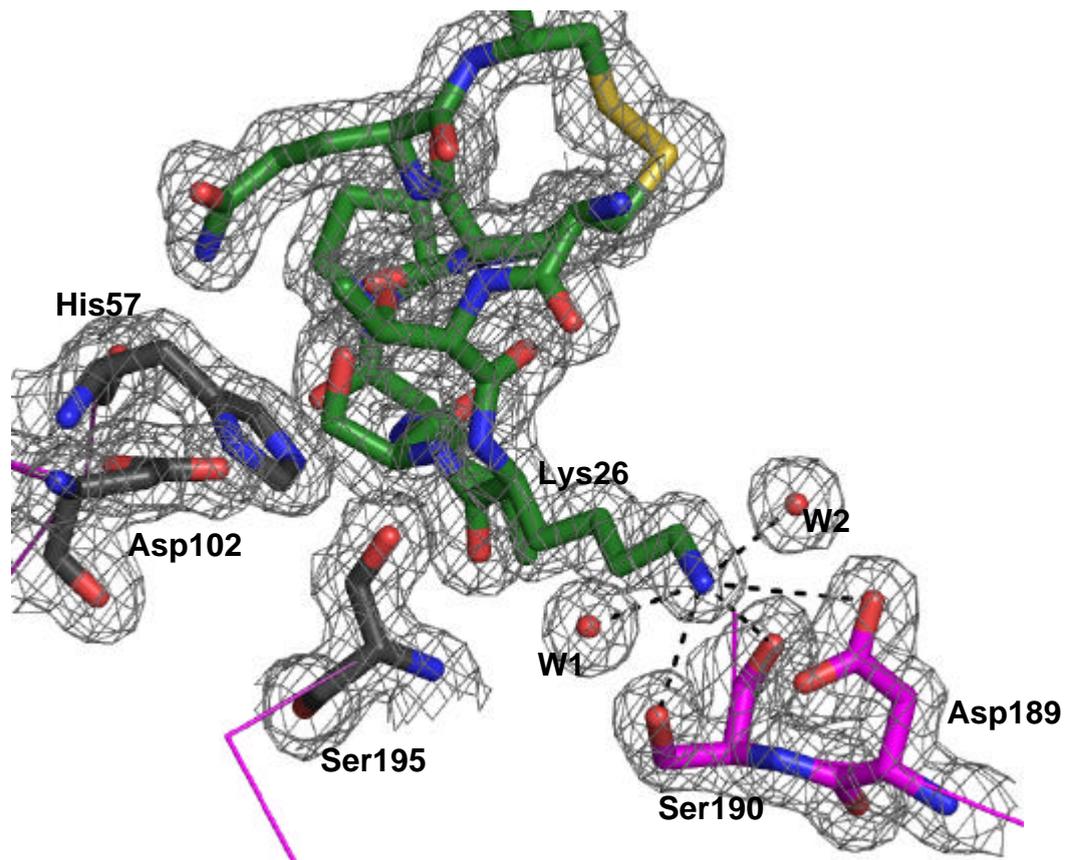
A região de interface da tripsina no complexo ternário é idêntica a do complexo binário com a tripsina. O sítio antitriptico apresenta predominância de contatos hidrofílicos, com a presença de várias ligações de hidrogênio. A cadeia lateral do resíduo P1 fica exposta ao solvente e disponível para a interação com a tripsina.

A conformação interna do sítio reativo do inibidor é mantida por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo P2 a P6 e P1' a P5'. Entre o inibidor e a enzima ocorrem ligações de hidrogênio entre o sítio reativo e as regiões 189 - 195 e 215 - 220 da enzima, sendo que o local da interação está bem próximo ao sítio catalítico da tripsina (figura 19).



**Figura 19.** Interação entre o BTCL (verde) mostrando as cadeias laterais dos resíduos P1-P6 e P1' a P5' e a tripsina (magenta) no complexo ternário mostrando as várias ligações de hidrogênio (preto – tabela 8) com algumas águas (esfera vermelha). O sítio catalítico Histidina 57, Aspartato 102, Serina 195 está representado em cinza. Para melhor visualização outras regiões foram omitidas.

Duas importantes pontes salinas características nos inibidores de tripsina ocorrem mediadas por duas moléculas de água, entre o grupo amino da extremidade da lisina 26 com a cadeia lateral carregada negativamente do resíduo do bolsão S1, aspartato 189 da região de especificidade da tripsina (figura 20). A água nessa região é fundamental para o mecanismo de hidrólise da tripsina, sendo necessária para o processo de deacilação, que resulta na hidrólise do peptídeo. Além disso, nessa região a maioria dos resíduos são carregados e polares.



**Figura 20.** Mapa de densidade eletrônica da interface de interação entre a lisina 26 do BTCI (verde) com as águas W1 e W2 (esfera vermelha), o Aspartato 189 e Serina 190 da tripsina (rosa) no complexo ternário, sítio catalítico, Histidina 57, Aspartato 102, Serina 195 (cinza). Em amarelo uma ligação dissulfeto no BTCI. Para melhor visualização outras regiões foram omitidas.

Conforme observado pelos valores de fator-B o sítio reativo para a tripsina apresenta pequenas alterações. Já foi demonstrado que durante a interação da enzima apenas uma pequena mudança conformacional ocorre (Bolognesi *et. al.*, 1982). Essas alterações conformacionais são decorrentes dos movimentos dos *loops* reativos 1 e 2, corroborando com dados reportados por De La Sierra *et. al.*, (1999) e é necessária para o ajuste preciso das duas enzimas ao inibidor.

A estrutura cristalográfica do ternário, aqui apresentada, mostra a predominância de contatos hidrofílicos e rigidez conformacional do sítio reativo para a tripsina. Essas características são responsáveis pela maior especificidade do sítio de lisina do inibidor para a tripsina, quando comparada com a especificidade para a quimotripsina. O mecanismo de reconhecimento da protease é disparado pela distribuição de resíduos hidrofílicos e nas regiões de domínio de contato com a tripsina.

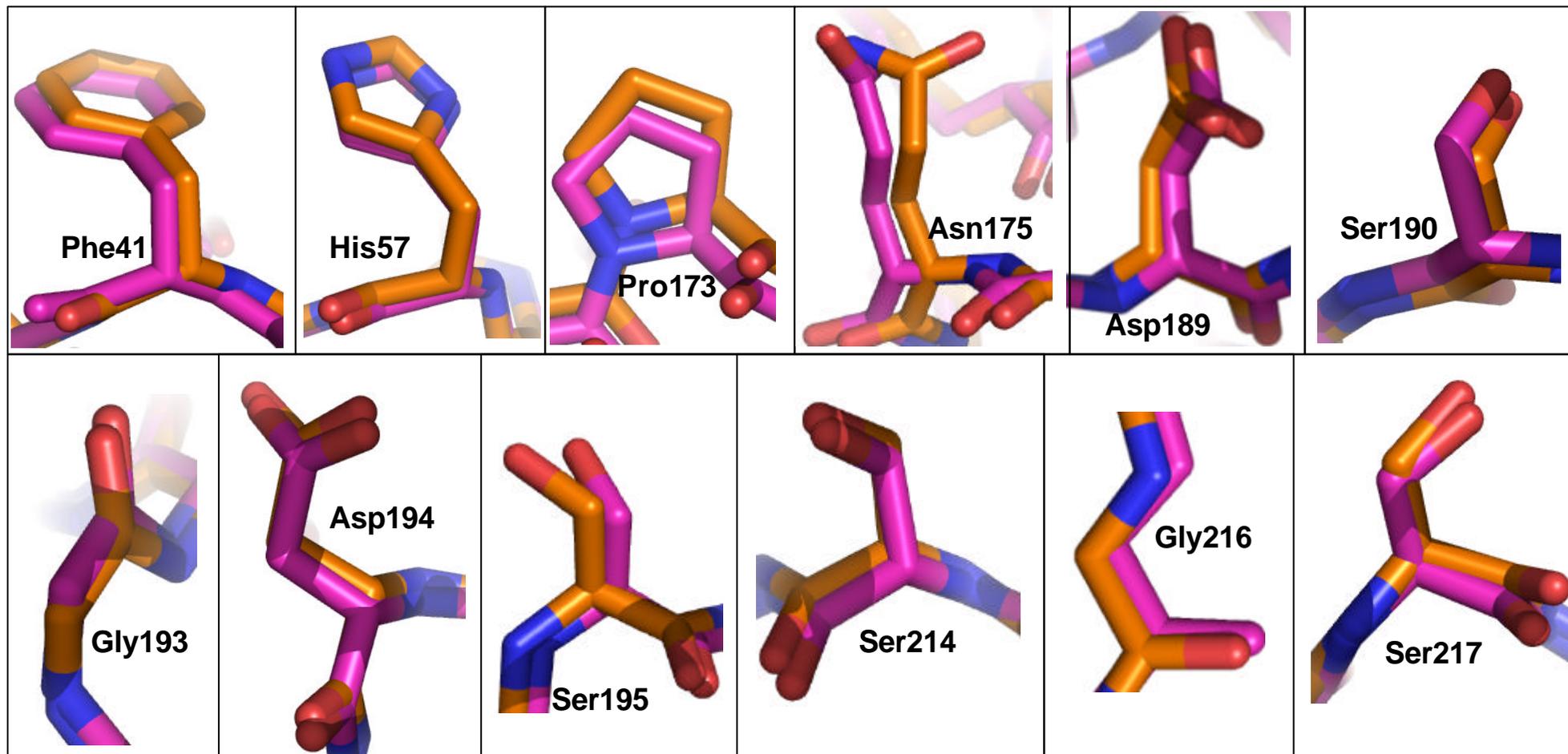
Rao e Suresh (2007) mostraram que mesmo durante a formação de dímeros de outro inibidor Bowman-Birk de *Vigna Unguiculata*, a tripsina pode interagir com o inibidor, uma vez que a estrutura do monômero não sofre alterações conformacionais. A rigidez conformacional desse sítio reativo é atribuída principalmente a presença de uma prolina conservada na posição P3' para o inibidor ativo e funcional (Brauer *et al.*, 2002). A presença desse *loop* canônico conservado em vários inibidores naturais ou sintéticos e potentes inibidores de tripsina da família BBI sugere que a manutenção da rigidez desta estrutura é essencial para a atividade (Costa e Yalikari, 2006). Estudos computacionais mostraram que a região do sítio reativo para a tripsina é rígido e independente. A substituição dos resíduos responsáveis pela rigidez (P3 Cys, P4' Pro, P6' Ile e ligações de hidrogênio intracadeia) leva a uma perda de atividade dos inibidores. Todos esses dados permitem concluir que o inibidor BTCI não sofre alterações conformacionais durante a formação do complexo, o que é justificável pela rigidez do *loop* reativo e pela presença das sete ligações dissulfeto.

**Tabela 8.** Contatos polares entre o BTCl, a tripsina e águas selecionadas no complexo ternário.

<b>BTCl</b>	<b>Tripsina</b>	<b>Águas</b>
<b>P6</b>		
Arg21:NH1	Pro173:O	
Arg21:NH1	Pro173:N	
Arg21:NH1		W555
Arg21:NH1		W183
<b>P5</b>		
Cys22:O	Ser217:OG	
Cys22:O		W52
Cys22:O		W112
Cys22:NH		W112
<b>P4</b>		
Glu23:OE1	Gln175:OE1	
Glu23:OE1		W202
Glu23:OE2		W831
<b>P3</b>		
Cys24:NH	Gly216:O	
Cys24:NH	Gly216:NH	
Cys24:O		W173
<b>P1</b>		
Lys26:NH	Ser214:O	
Lys26:NH	Ser195:OG	
Lys26:O	Gly193:NH	
Lys26:O	Ser195:NH	
Lys26:O	Asp194:NH	
Lys26:NZ	Ser190:O	
Lys26:NZ	Ser190:OG	
Lys26:NZ	Asp189:OD2	
Lys26:NZ		W71
Lys26:NZ		W537
<b>P1'</b>		
Ser27:OG		W122
<b>P2'</b>		
Ile28:NH	Phe41:O	
Ile28:O		W263
<b>P3'</b>		
Pro29:O		W122
<b>P4'</b>		
Pro30:O		W97
<b>P5'</b>		
Gln31:NE2		W95
Gln31:NE2	His57:O	
Gln31:NE1		W172
Gln31:NE1		W251
Gln31:O		W833
<b>P6'</b>		
Cis32:O		W36
<b>P7'</b>		
Arg33:NH1		W831
Arg33:NH1		W703
Arg33:NH2		W703
Arg33:NE		W833

A sobreposição entre a tripsina em estado livre e a tripsina em complexo ternário resultou em um RMSD de 0,91 para todos os átomos e 0,69 para a cadeia principal. Esses valores indicam que não ocorrem mudanças conformacionais significativas nas enzimas durante a formação dos complexos. Em especial, foram analisados individualmente os resíduos responsáveis pela interação entre a enzima e o inibidor no complexo ternário (tabela 8). Conforme indicado na figura 21, não foram observadas grandes mudanças nos resíduos da interface da enzima com a formação do complexo.

Para melhor observação das alterações conformacionais do triptofano foram realizados os experimentos de fluorescência dinâmica, que serão discutidos na próxima seção em conjunto com as informações da estrutura tridimensional obtida.



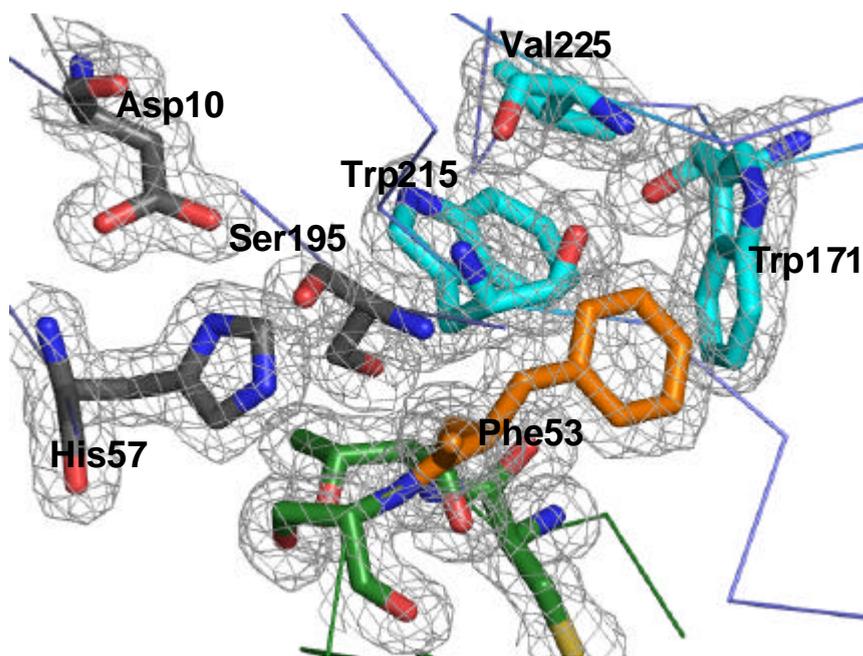
**Figura 21.** Resíduos responsáveis pela interação do inibidor com a enzima - sobreposição da tripsina do complexo ternário (magenta) com a tripsina livre (laranja – 2PTN Walter *et. al.*, 1982).

## 5.10 Análise da região de interface da quimotripsina

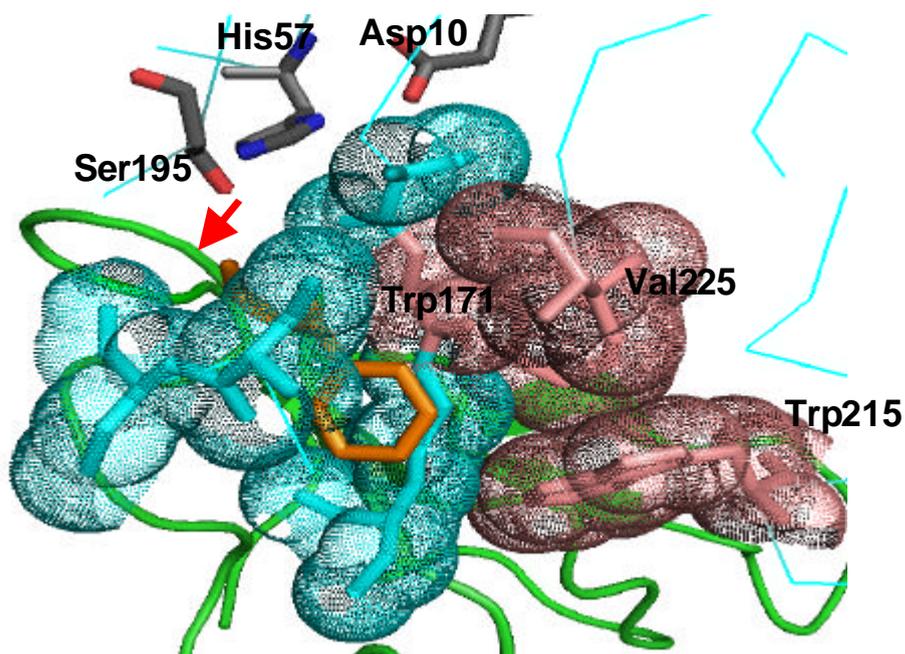
A conformação do sítio reativo é mantida por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo P2 e P8, expondo a cadeia lateral de P1 para a interação com a quimotripsina. A maioria dos resíduos presentes na região de interação entre o inibidor e a quimotripsina é composta por resíduos apolares. Isso favorece o posicionamento da fenilalanina 53 (resíduo P1) do inibidor na enzima (figura 22). Os resíduos do sítio ativo da quimotripsina (57, 102, 195) fazem parte da região de contato com o inibidor e são importantes para a interação entre as proteínas por realizarem ligações de hidrogênio conforme a tabela abaixo. O bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Trp171, Trp 215, e Val225 da quimotripsina permitem a acomodação da fenilalanina 53 do inibidor por meio de interações hidrofóbicas (figura 23).

**Tabela 9.** Contatos polares entre o BTCI, a quimotripsina e águas selecionadas no complexo ternário.

<b>BTCI</b>	<b>Quimotripsina</b>	<b>Águas</b>
<b>P5</b> Cys49: O	Ser218:OG	
<b>P3</b> Cys51:NH	Gly216:O	
Cys251:O	Gly216:NH	
<b>P2</b> Tre52:NH	Ser214:O	
Tre52:NH	Ser195:OG	
<b>P1</b> Phe53:O	Ser195:NH	
Phe53:O	Gly193:NH	
Phe53:O	Asp194:NH	
Phe53:NH	Ser214:O	
Phe53:NH	Ser195:OG	
<b>P2'</b> Ile55:NH	Phe41:O	
<b>P5'</b> Gln58:OE1		W246
Gln58:OE1		W448
Gln31:NE2	His57:O	
Gln31:NE2		W175



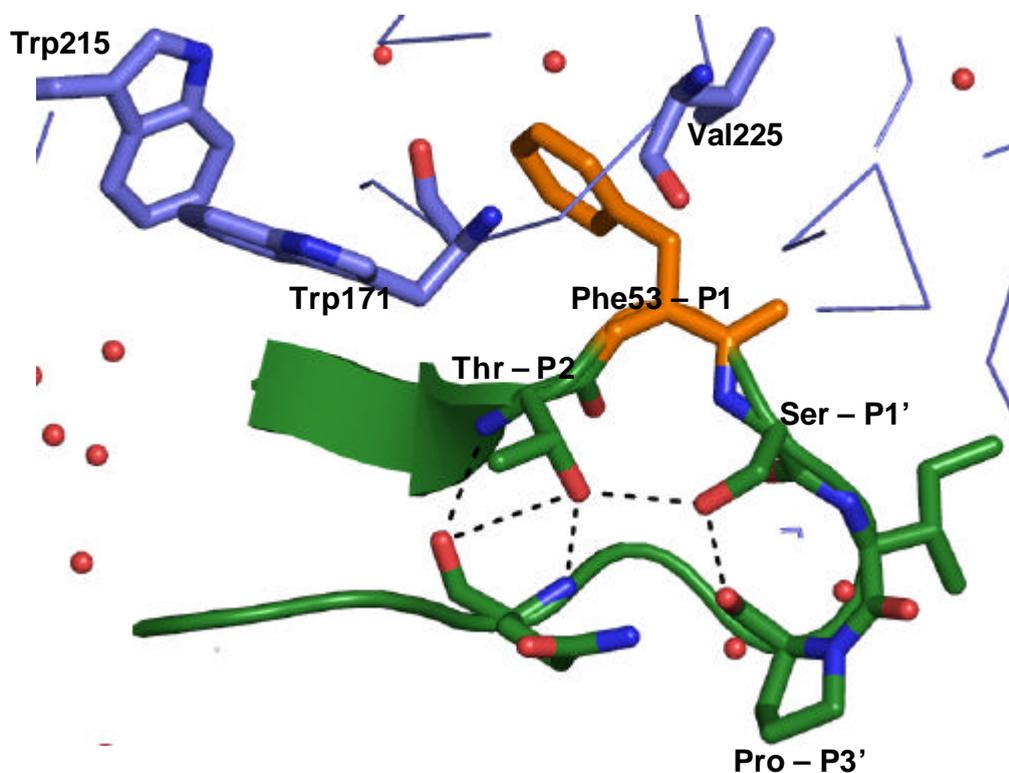
**Figura 22.** Mapa de densidade eletrônica do BICI (verde) em complexo ternário. Resíduo P1 Phe53 (laranja) na região de interação com a quimotripsina (ciano) e em destaque estão os resíduos Trp171, Trp215, Val 225 (ciano) e a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195 (cinza).



**Figura 23.** Representação estrutural em superfície e de van der Waals da interface do BICI (verde) em complexo (ternário) com o resíduo P1 Phe53 (laranja) em destaque dentro do bolsão da quimotripsina (ciano). Os resíduos Trp171, Trp215, e Val225 (salmão) e His57, Asp102 e Ser195 (cinza) da quimotripsina são mostrados. A seta vermelha indica a região da cadeia do inibidor a ser hidrolisada. Para melhor visualização alguns trechos das moléculas foram omitidos.

O *loop* contendo o sítio reativo do BTCI para a quimotripsina contém uma treonina altamente conservada na posição P2 (Thr52). A importância deste resíduo foi confirmada por *loops* sintéticos de BBI. A cadeia lateral da treonina apresenta dupla função: ligação intramolecular de hidrogênio (por meio do grupo -OH) e formação de interações hidrofóbicas com a enzima por meio da cadeia lateral do grupo -CH3 (Song *et. al.*, 1999; Brauer e Leatherbarrow, 2003).

O inibidor apresenta outros resíduos altamente conservados: a serina na posição P1' e a prolina na posição P3'. A serina está envolvida em ligações de hidrogênio intramoleculares (figura 24).



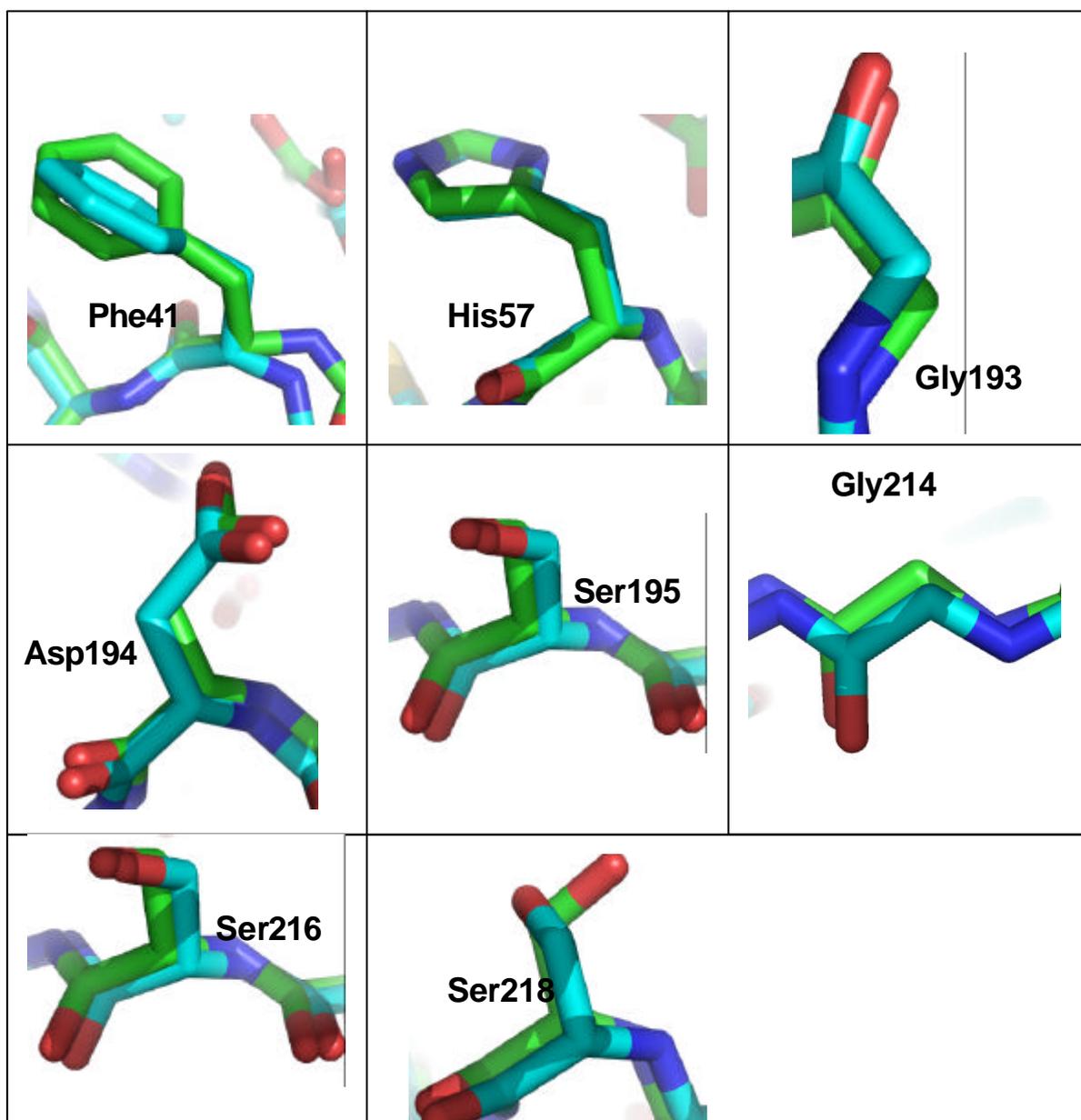
**Figura 24.** Região de interface da quimotripsina (azul) com o BTCI (verde) em complexo ternário, com o resíduo P1 Phe53 (laranja) em destaque. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pretas tracejadas. As águas são exibidas como esferas. Para melhor visualização alguns trechos das moléculas foram omitidos, incluindo o sítio catalítico da enzima.

Aparentemente, a estrutura do inibidor não sofre variações de forma quando está em complexo binário com a tripsina e em complexo ternário, nem na região do domínio antiquimotriptico. Isso ocorre devido à presença das sete ligações dissulfeto, que conferem a rigidez da estrutura do inibidor. Os resultados observados mostram que a rigidez do BBIs é responsável por manter a estrutura da proteína sem ou com poucas mudanças conformacionais durante a formação do complexo. As pequenas alterações conformacionais são decorrentes dos movimentos dos *loops* reativos 1 e 2, corroborando com dados reportados por De La Sierra *et. al.*, 1999. Esta mobilidade é necessária para o ajuste preciso das duas enzimas ao inibidor.

Koepke *et. al.*, 2000 mostraram que no complexo ternário entre BBI de soja e duas moléculas de tripsina a conformação de cadeias laterais pode mudar drasticamente no sítio reativo responsável pela inibição de quimotripsina. Neste caso, o sítio adicional para ligação de tripsina está localizado no domínio do sítio reativo de quimotripsina, no caso do BTCl. A estrutura cristalográfica do ternário, aqui apresentada, mostra a predominância de contatos hidrofóbicos e que a flexibilidade conformacional do sítio reativo para a quimotripsina é devida a presença da tripsina e que isto é quase inexistente quando a molécula original (quimotripsina) está presente.

A sobreposição entre a quimotripsina em estado livre e a quimotripsina em complexo ternário resultou em um RMSD de 0,83 para todos os átomos e 0,46 para a cadeia principal. Esses valores indicam que não ocorrem mudanças conformacionais nas enzimas durante a formação dos complexos. Em especial, foram analisados individualmente os resíduos responsáveis pela interação entre a enzima e o inibidor no complexo ternário (tabela 9). Conforme indicado na figura 26, não foram observadas mudanças no posicionamento dos resíduos da interface da enzima com a formação do complexo. Esses dados mostram

que não há mudanças na estrutura do inibidor quando interage com as enzimas formando os complexos binário ou ternário.



**Figura 25.** Resíduos da quimotripsina responsáveis pela interação com o inibidor - sobreposição da quimotripsina do complexo ternário (verde) com a quimotripsina livre (cyano – 4cha Tsukada e Blow, 1985).

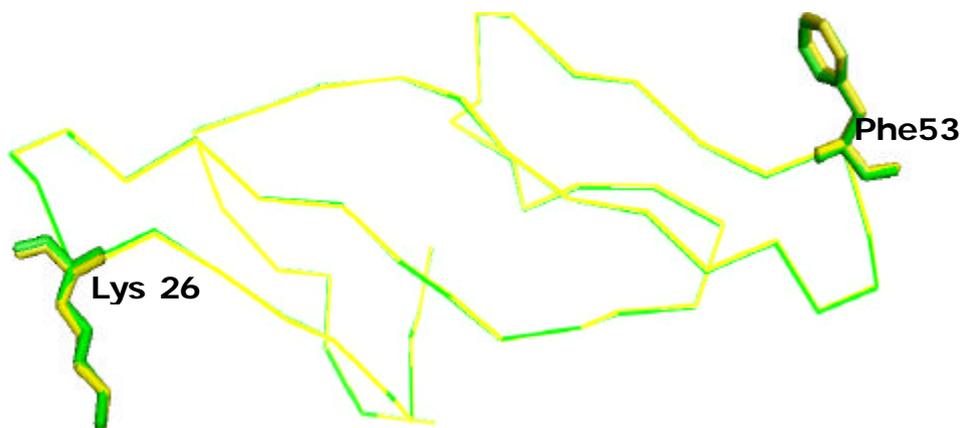
Para melhor observação das alterações conformacionais dos triptofanos foram realizados os experimentos de fluorescência dinâmica, que serão discutidos na próxima seção em conjunto com as informações da estrutura tridimensional obtida.

Conforme observado nas figuras 21 e 25, todos os resíduos de contato da tripsina e da quimotripsina que estão na região de interface sofrem poucas alterações conformacionais na comparação entre a enzima livre e em complexo. Estes resultados confirmam que as mudanças conformacionais ocorrem nas enzimas, na região de interface dos complexos.

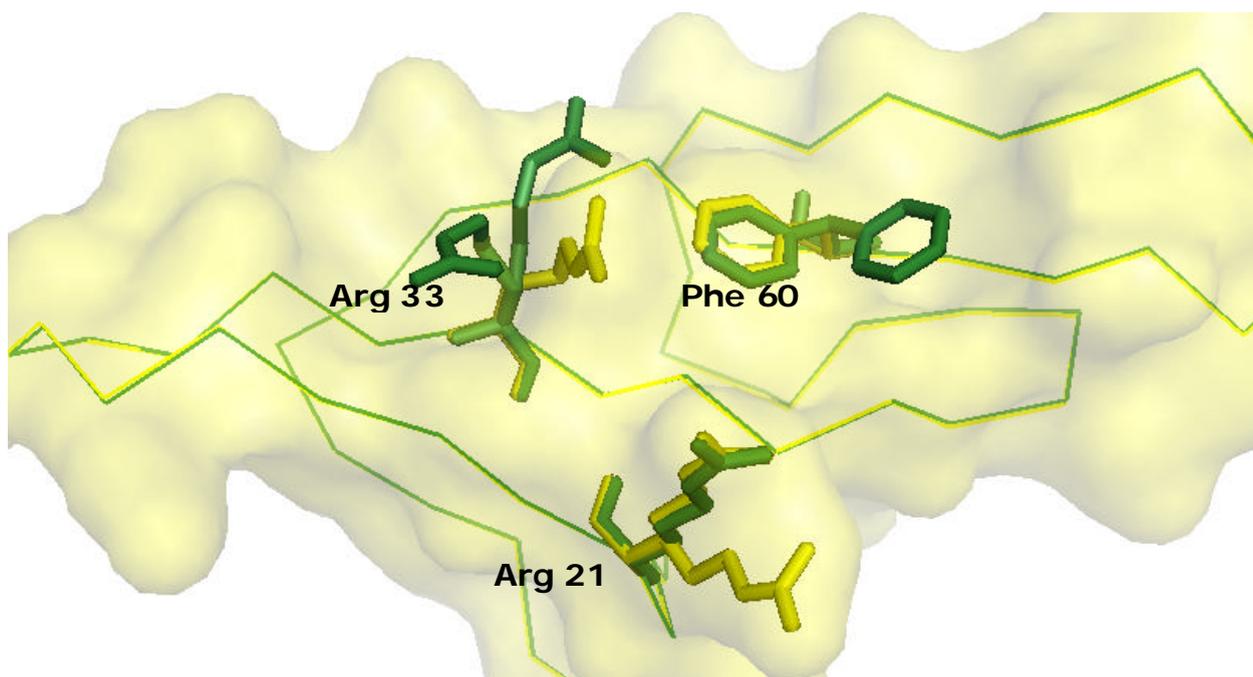
A estrutura cristalográfica do ternário, aqui apresentada, mostra a predominância de contatos hidrofílicos e rigidez do sítio reativo para a tripsina enquanto contatos hidrofóbicos e flexibilidade conformacional do sítio reativo para a quimotripsina. Essas características são responsáveis pela maior especificidade do inibidor para a tripsina comparada com a especificidade para a quimotripsina e confirmam que o BTCI apresenta sítios reativos independentes. Esses dados são inéditos uma vez que, até a presente data, não existe nenhum complexo ternário envolvendo inibidores BBI com tripsina e quimotripsina simultaneamente, nem estruturas de um mesmo complexo ternário envolvendo BBI que cristalizaram em diferentes pHs.

### **5.11 Análise das diferenças na estrutura tridimensional observadas com a alteração do pH**

Para analisar as diferenças conformacionais nas estruturas tridimensionais do complexo ternário nos pHs 4,5 e 7,5, a sobreposição das duas moléculas foi realizada. O RMSD obtido considerando apenas o BTCI foi de 0,16 para os átomos C $\alpha$ , 0,34 considerando a cadeia principal e de 1,07 considerando todos os átomos (figura 26).



**Figura 26.** Sobreposição da cadeia principal do BTCL em pH 7,5 (amarelo) e 4,5 (verde) mostrando os resíduos lisina 26 e fenilalanina 53.



**Figura 27.** Sobreposição da cadeia principal do BTCL em pH 7,5 (amarelo) e 4,5 (verde) mostrando as diferenças de conformação das cadeias laterais dos resíduos arginina 21 e 33 e fenilalanina 60.

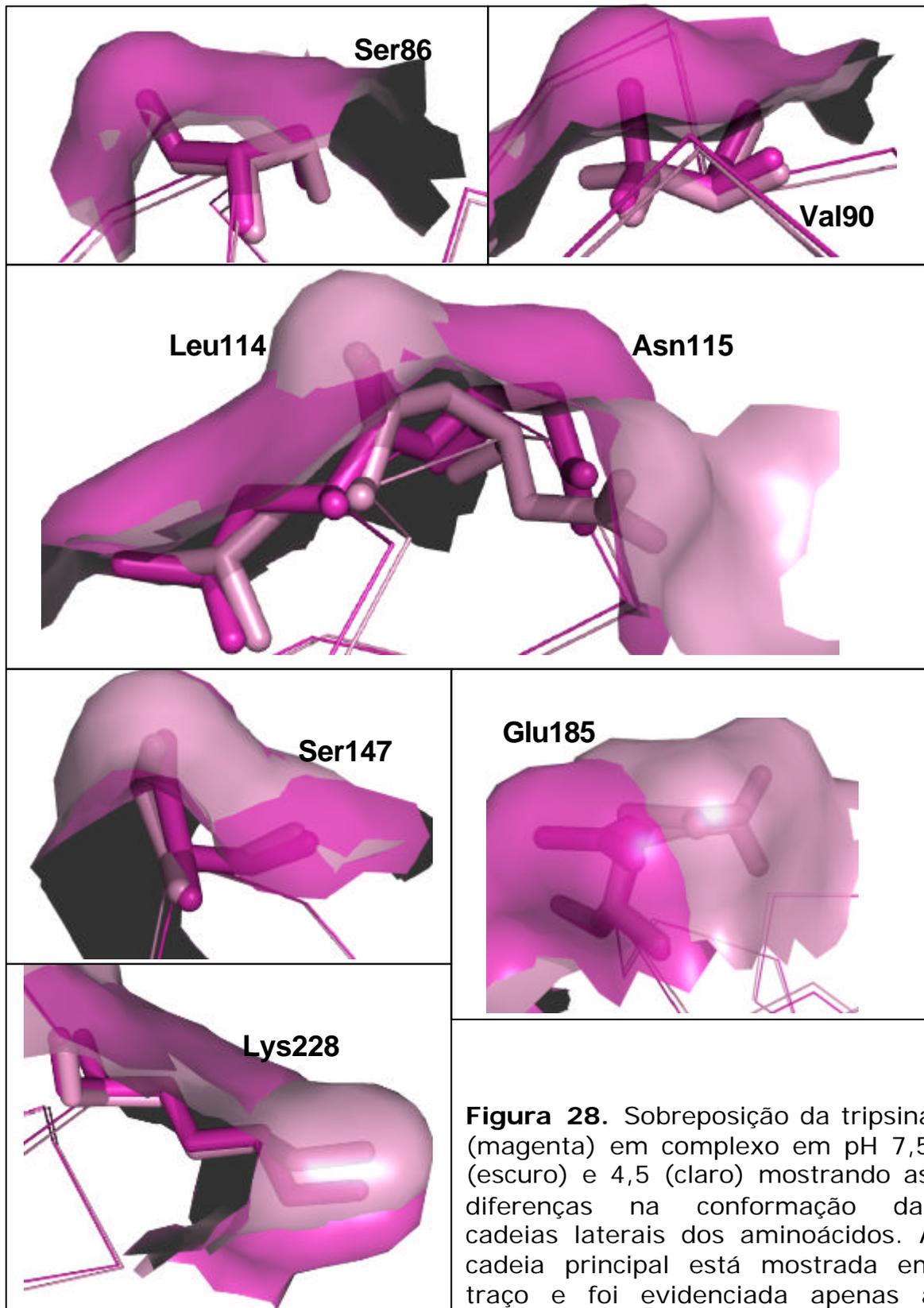
Valores de RMSD com valores entre 1 a 3 indicam que as estruturas comparadas são similares, e com valores acima de 3 são consideradas estruturas com diferenças significativas na estrutura. Os valores de RMSD estimados para a cadeia principal do BTC1 nos diferentes pHs indicaram que essa proteína não apresenta diferenças na sua estrutura. No entanto, a arginina 21 e fenilalanina 60 apresentam dupla conformação em pH 7,5 e apenas uma conformação foi encontrada quando em pH 4,5. O resíduo arginina 33 apresentou dupla conformação em pH 4,5 e apenas uma conformação em pH 7,5 (figura 27). Todos esses resíduos encontram-se na superfície do BTC1 e não fazem contato com as enzimas. Portanto, a diferença no número de conformações representa um estado no qual o resíduo pode realizar maior ou menor número de interações, e, nesse caso, parecem depender do pH do meio.

A mesma análise (comparação nos dois pHs obtidos) foi realizada para as enzimas. O RMSD obtido na sobreposição da tripsina em pH 4,5 e 7,5 foi de 0,13 para os átomos C $\alpha$ , 0,12 considerando a cadeia principal e de 0,34 considerando todos os átomos (tabela 10). Observando individualmente os resíduos foi verificado que a maioria desses resíduos apresentam diferenças apenas nos rotâmeros (6 casos) e 1 resíduo apresenta dupla conformação em pH 7,5 e conformação simples em pH 4,5. Além disso, todos esses resíduos encontram-se na superfície (figura 28) e não interagem com o BTC1 (não estão listados na tabela 8), e, portanto, não representa nenhuma diferença estrutural que possa influenciar a funcionalidade do inibidor.

**Tabela 10.** Resíduos da tripsina que apresentam diferenças conformacionais nos pHs 4,5 e 7,5.

<b>Resíduo</b>	<b>pH 4,5</b>	<b>pH 7,5</b>
Ser 86	Diferença de rotâmeros	
Val 90	Diferença de rotâmeros	
Leu 114	Diferença de rotâmeros	
Asn 115	Diferença de rotâmeros	
Ser 147	Diferença de rotâmeros	
Glu 185	Conformação simples	Dupla conformação
Lys 228	Diferença de rotâmeros	

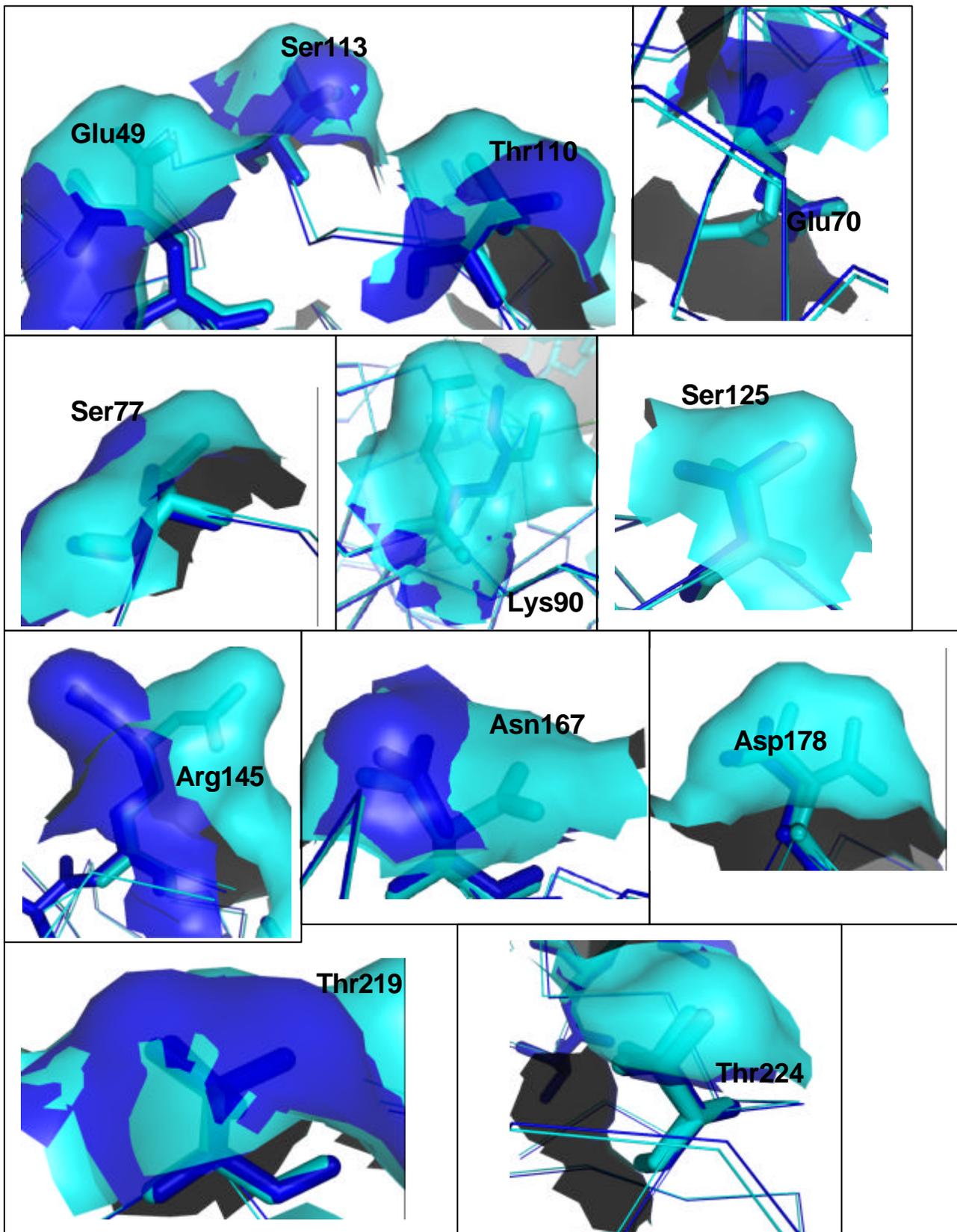
Para a quimotripsina nos dois pHs o valor do RMSD foi de 0,40 para os átomos de  $C\alpha$ , 0,39 considerando a cadeia principal e de 0,65 considerando todos os átomos. Com a variação de pHs a quimotripsina apresentou maior número de mudanças conformacionais (tabela 11). Observando individualmente os resíduos foi verificado que 9 resíduos apresentam dupla conformação em um dos pHs (8 deles em pH 4,5) e 3 resíduos apresentam diferentes rotâmeros. Todos os resíduos analisados estão na superfície (figura 29) e não participam do contato com o BTC1 (não estão na tabela 9).



**Figura 28.** Sobreposição da tripsina (magenta) em complexo em pH 7,5 (escuro) e 4,5 (claro) mostrando as diferenças na conformação das cadeias laterais dos aminoácidos. A cadeia principal está mostrada em traço e foi evidenciada apenas a superfície dos resíduos selecionados.

**Tabela 11.** Resíduos da quimotripsina que apresentam diferenças conformacionais nos pHs 4,5 e 7,5.

<b>Resíduo</b>	<b>pH 4,5</b>	<b>pH 7,5</b>
Glu 49	Dupla conformação	Conformação simples
Glu 70	Dupla conformação	Conformação simples
Ser 77	Diferença de rotâmeros	
Lys 90	Dupla conformação	Conformação simples
Thr 110	Dupla conformação	Conformação simples
Ser 113	Dupla conformação	Conformação simples
Ser 125	Diferença de rotâmeros	
Arg 145	Diferença de rotâmeros	
Asn 167	Dupla conformação	Conformação simples
Asp 178	Dupla conformação	Conformação simples
Thr 219	Conformação simples	Dupla conformação
Thr 224	Dupla conformação	Conformação simples



**Figura 29.** Sobreposição da quimotripsina (azul) em complexo em pH 7,5 (escuro) e 4,5 (claro) mostrando as diferenças nas cadeias laterais dos aminoácidos indicados. A cadeia principal está mostrada em traço e foi evidenciada apenas a superfície dos resíduos selecionados.

## 5.12 Análise do tempo de vida de fluorescência

Fluorescência dinâmica permite calcular o tempo de vida de fluorescência, isto é, tempo em que os elétrons do fluoróforo permanecem no estado excitado e retornam ao estado fundamental. Com isto é possível avaliar se uma amostra contém fluoróforos distintos e em ambientes enterrados ou expostos ao solvente, ou se o ambiente do fluoróforo sofre mudanças conformacionais em decorrência da aproximação de grupos carregados ou por associação de moléculas na formação de complexos ou associação desses grupos com o próprio fluoróforo. Essas análises possibilitam fazer uma previsão da dinâmica das interações entre macromoléculas.

A determinação do modelo que melhor descreve o decaimento da emissão de fluorescência para o BTCl sozinho e em complexos binário e ternário com a  $\alpha$ -quimotripsina e a  $\beta$ -tripsina, bem como o número adequado de tempos de vida para essas moléculas foram analisados em primeiro lugar. O melhor modelo obtido foi aplicado para o estudo da interação entre as moléculas.

Os dados de espectroscopia de fluorescência dinâmica (figura 30) foram inicialmente analisados com um, dois e três decaimentos de emissão de fluorescência (tempo de vida) para os diferentes modelos disponíveis pelo software VINCI (ISS Inc.), analisando os modelos: *Discreto*, *Plank*, *Lorentz*, *Gauss* e *Uniforme*. Em todos os casos analisados o modelo *Uniforme* não apresentou resultados significativos, indicados pelos altos valores de  $\chi^2$ .

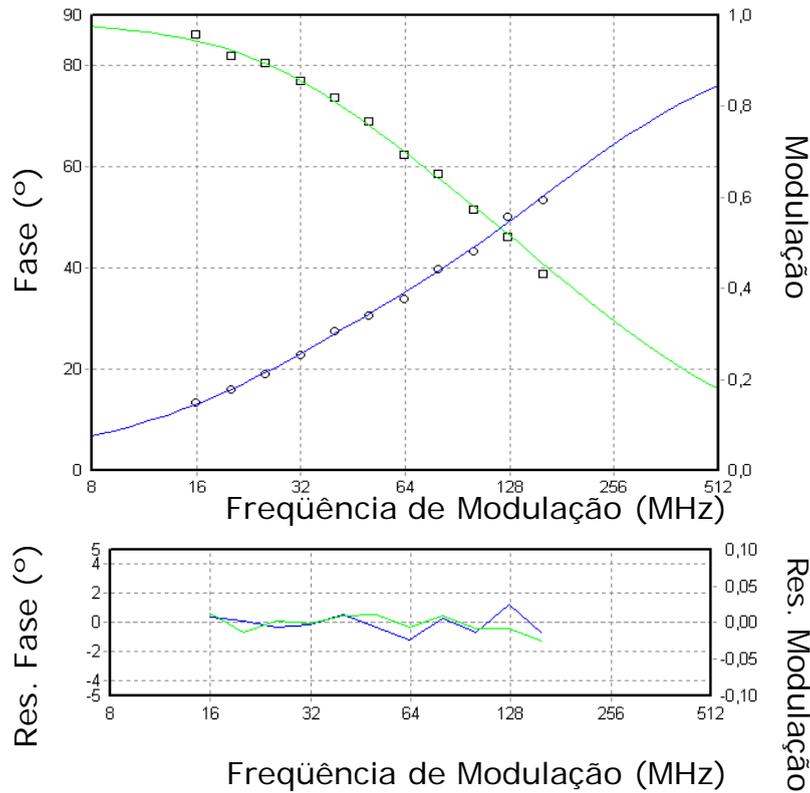
Os dados obtidos após a análise dos valores ajustados de fluorescência dinâmica para o BTCl e seus complexos estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 12.** Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência do BTCl em complexo ternário

Modelo	Tempos de vida (ns)														
	Um			Dois					Três						
	$\chi^2_{ns}$	?	$\chi^2$	$\tau_{1ns}$ ( $f_1$ )	?	$\tau_{2ns}$ ( $f_2$ )	?	$\chi^2$	$\tau_{1ns}$ ( $f_1$ )	?	$\tau_{2ns}$ ( $f_2$ )	?	$\tau_{3ns}$ ( $f_3$ )	?	$\chi^2$
Discret	1,85	0,004	406	1,05 (0,496)	0,02 (0,01)	3,76 (0,490)	0,08 (0,01)	11,1	3,48E-09 (0,0482)	0,002 (0,005)	1,44 (0,603)	0,05 (0,02)	4,72 (0,347)	0,3 (0,02)	8,59
Planck	1,85	0,004	406	1,05 (0,496)	0,02 (0,01)	3,76 (0,490)	0,08 (0,01)	11,1	3,48E-09 (0,0482)	0,002 (0,005)	1,44 (0,603)	0,05 (0,02)	4,72 (0,347)	0,3 (0,02)	8,59
Lorenz	1,83	0,008	9,58	1,81 (0,983)	0,1 (0,09)	1,83E-05 (0,145)	5 (2,0)	11,5	1,63 (0,854)	0,4 (0,3)	5,68 (0,141)	3 (0,3)	2,89E+03 (4,13)	5,00E+08 (9E+3)	12,6
Gaus	2,06	0,01	18,4	1,59 (0,747)	0,1 (0,05)	5,28 (0,250)	0,6 (0,05)	10,1	1,58 (0,745)	0,1 (0,07)	5,27 (0,251)	0,7 (0,07)	2,40E+03 (1,03E-8)	0 (0,0)	12,4
Uniform	0,932	8	44,9	1,15 (0,498)	3,00E+03 (2,0)	3,81 (0,493)	2,00E+04 (2,0)	11,2	1,73 (0,703)	0,9 (0,3)	1,76 (0,293)	1,00E+03 (0,2)	2,26E+03 (1,95)	0 (3,0)	55

**Tabela 13.** Dados obtidos dos valores ajustados de fluorescência dinâmica para o BTCl e seus complexos

Complexos	Modelo	Modo	$\chi^2$ (ns)	f1	$\chi^2$ (ns)	f2	c?
BTCl - quimotripsina	Discreto	bimodal	$0,839 \pm 0,02$	$0,280 \pm 0,007$	$4,050 \pm 0,05$	$0,713 \pm 0,006$	14,64
BTCl - tripsina	Lorenz	monomodal	$1,840 \pm 0,007$	1,00 (fixo)	-	-	14,47
BTCl - ternário	Discreto	bimodal	$1,050 \pm 0,02$	$0,496 \pm 0,01$	$3,760 \pm 0,08$	$0,490 \pm 0,01$	11,10
BTCl - livre pH 4,0	Discreto	bimodal	$1,040 \pm 0,02$	$0,556 \pm 0,01$	$3,560 \pm 0,08$	$0,422 \pm 0,01$	41,71
BTCl - livre pH 5,0	Discreto	bimodal	$1,102 \pm 0,03$	$0,396 \pm 0,02$	$3,227 \pm 0,08$	$0,578 \pm 0,02$	29,52
BTCl - livre pH 6,0	Discreto	bimodal	$1,166 \pm 0,04$	$0,282 \pm 0,02$	$3,651 \pm 0,06$	$0,710 \pm 0,01$	16,95
BTCl - livre pH 7,0	Discreto	bimodal	$0,711 \pm 0,05$	$0,130 \pm 0,01$	$2,921 \pm 0,03$	$0,848 \pm 0,01$	27,03
BTCl - livre pH 8,0	Discreto	bimodal	$1,713 \pm 0,06$	$0,414 \pm 0,04$	$3,979 \pm 0,1$	$0,585 \pm 0,03$	20,48
BTCl - livre pH 9,0	Discreto	bimodal	$0,618 \pm 0,06$	$0,077 \pm 0,006$	$3,450 \pm 0,03$	$0,907 \pm 0,006$	16,05
BTCl - livre pH 10,0	Discreto	bimodal	$1,049 \pm 0,05$	$0,186 \pm 0,01$	$3,575 \pm 0,05$	$0,777 \pm 0,01$	38,75

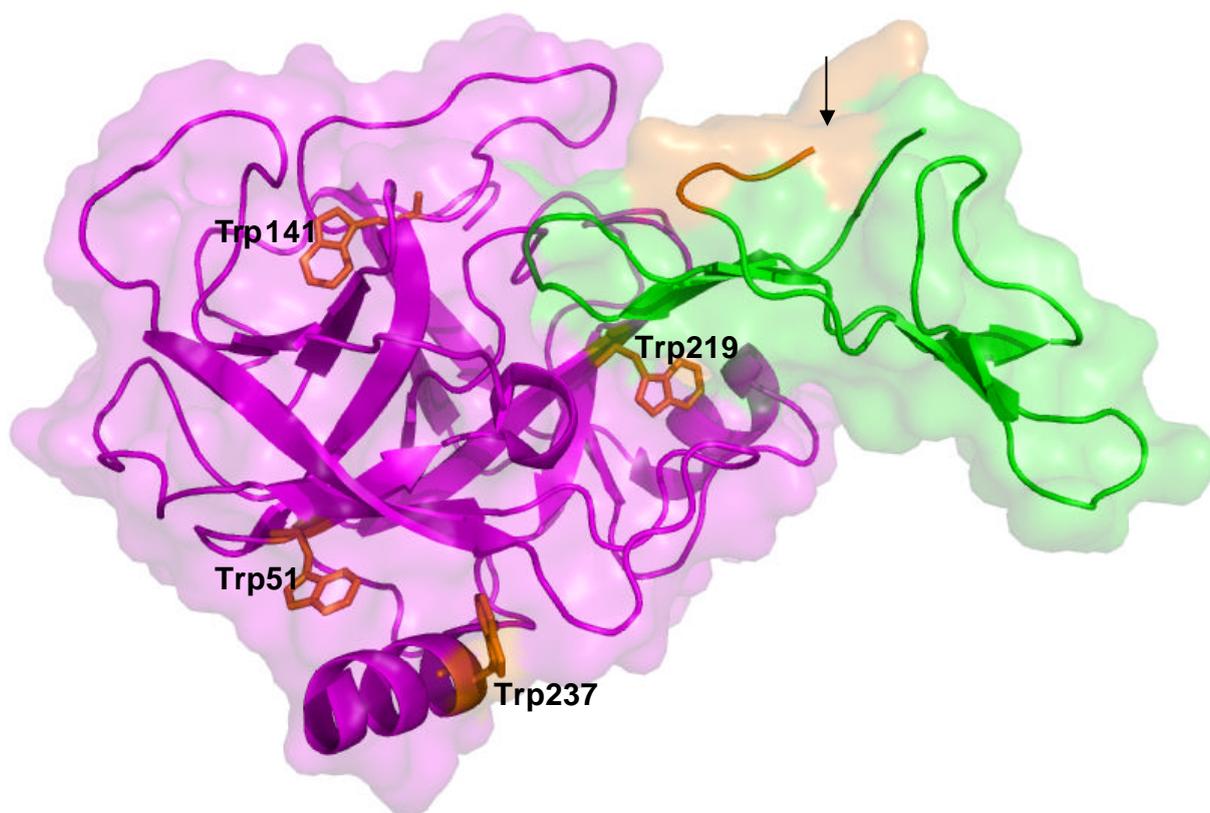


**Figura 30.** Gráfico da diferença de fase (círculo) e da modulação (quadrado) obtidas em relação à fase (verde) e modulação calculadas (azul) do modelo em função da frequência de modulação em MHz para o tempo de vida do complexo ternário. Abaixo estão representados os valores residuais após o ajuste para o modelo bimodal discreto.

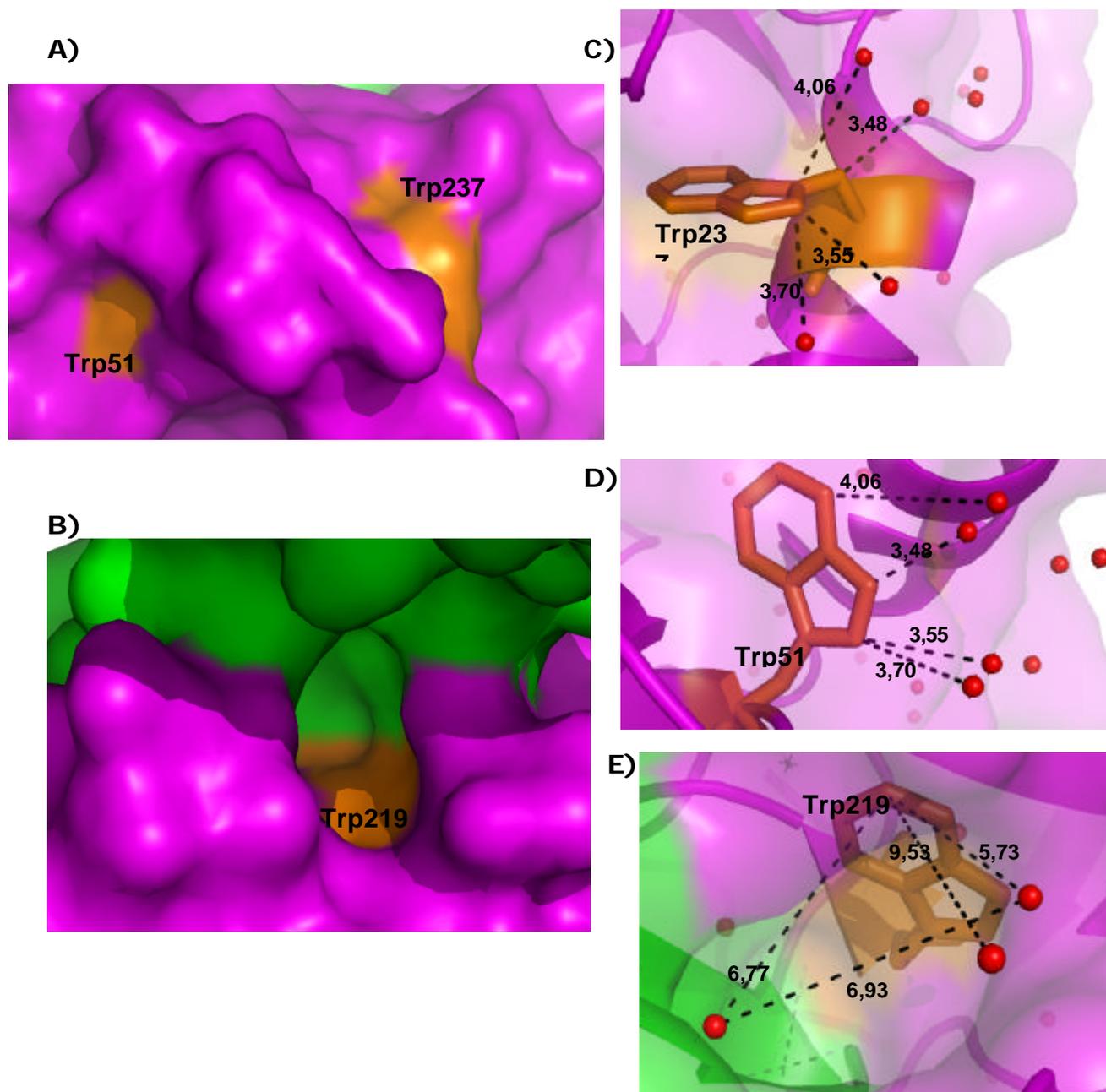
Neste trabalho foi utilizado um filtro WG UV-320 para as medidas de fluorescência. Este filtro corta a luz espalhada para excitação abaixo de 320 nm, excluindo toda luz de origem diferente da fluorescência e que não foram consideradas nos nossos cálculos.

### 5.12.1 Complexo binário com a tripsina

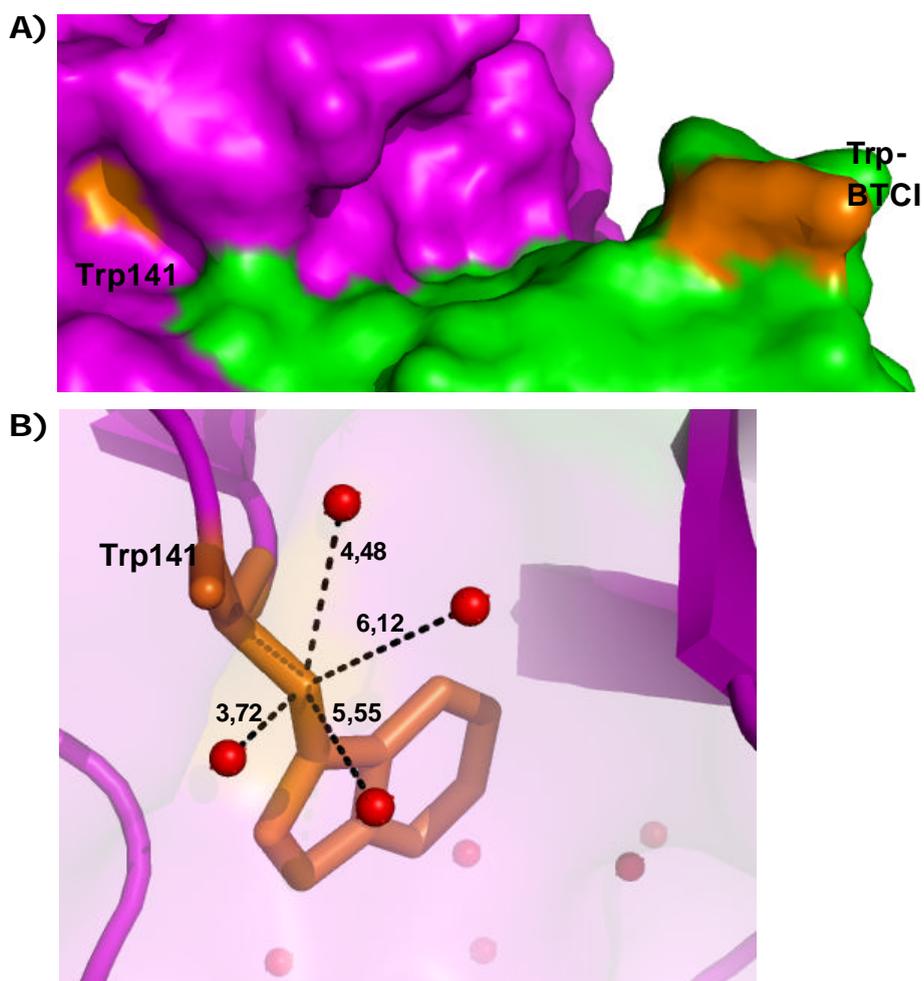
Em complexo binário com a tripsina, o ajuste para apenas um tempo de vida apresentou resultados satisfatórios para os modelos de distribuição *Lorentz* e de *Gauss*, como indicado pelos valores de  $\chi^2$ , sendo o melhor ajuste o tipo *Lorentz*. Os ajustes com dois e três tempos de vida, apesar de valores baixos de  $\chi^2$ , apresentavam taxa de erro muito superior para dois tempos de vida, ou valores incoerentes no caso de três tempos de vida, e por isso, não foram considerados.



**Figura 31.** Modelo do complexo binário do BTCl (verde) com a tripsina (magenta) com os triptofanos (laranja) em evidência. A seta indica a região de localização do triptofano do BTCl.



**Figura 32.** Representação da superfície molecular da tripsina e dos triptofanos (em laranja). Triptofanos expostos (A e B) e em interação com o solvente (C a E).



**Figura 33.** Representação da superfície molecular da tripsina e triptofanos (em laranja) evidenciando sua localização na superfície (A) e sua exposição e interação com o solvente (B).

O valor do tempo de vida obtido para o complexo binário com a tripsina foi de 1,84 ns, o que significa que toda a população de triptofanos formada pelo único triptofano do BTCI e pelos quatro triptofanos da tripsina se comporta de maneira semelhante. O valor encontrado indica que os triptofanos estão expostos e acessíveis ao solvente, o que pode ser confirmado pela estrutura tridimensional obtida por difração de raios X. As mudanças nas posições dos triptofanos indicam mudanças conformacionais na estrutura das moléculas.

O resíduo Trp 219 da tripsina, próximo da região de interação com o BTCl, apesar de parecer estar parcialmente enterrado está localizado em uma fenda que permite a interação com o solvente (figura 32 B, D). Isso pode ser confirmado observando a estrutura tridimensional, que mostra que os quatro triptofanos da tripsina e o único do BTCl, expostos ao solvente, corroborando o resultado obtido nos experimentos de fluorescência dinâmica.

### **5.12.2 Complexo binário com a quimotripsina**

O complexo binário com a quimotripsina apresentou decaimento de fluorescência complexo. Os ajustes para um tempo de vida foram inadequados, sendo o melhor ajuste bimodal do tipo Discreto. Os ajustes com três tempos de vida, com valores de  $\chi^2$  inferiores apresentaram uma taxa de erro muito superior em outros casos de dois tempos de vida, ou valores incoerentes, no caso de três tempos de vida e, por isso, também não foram considerados.

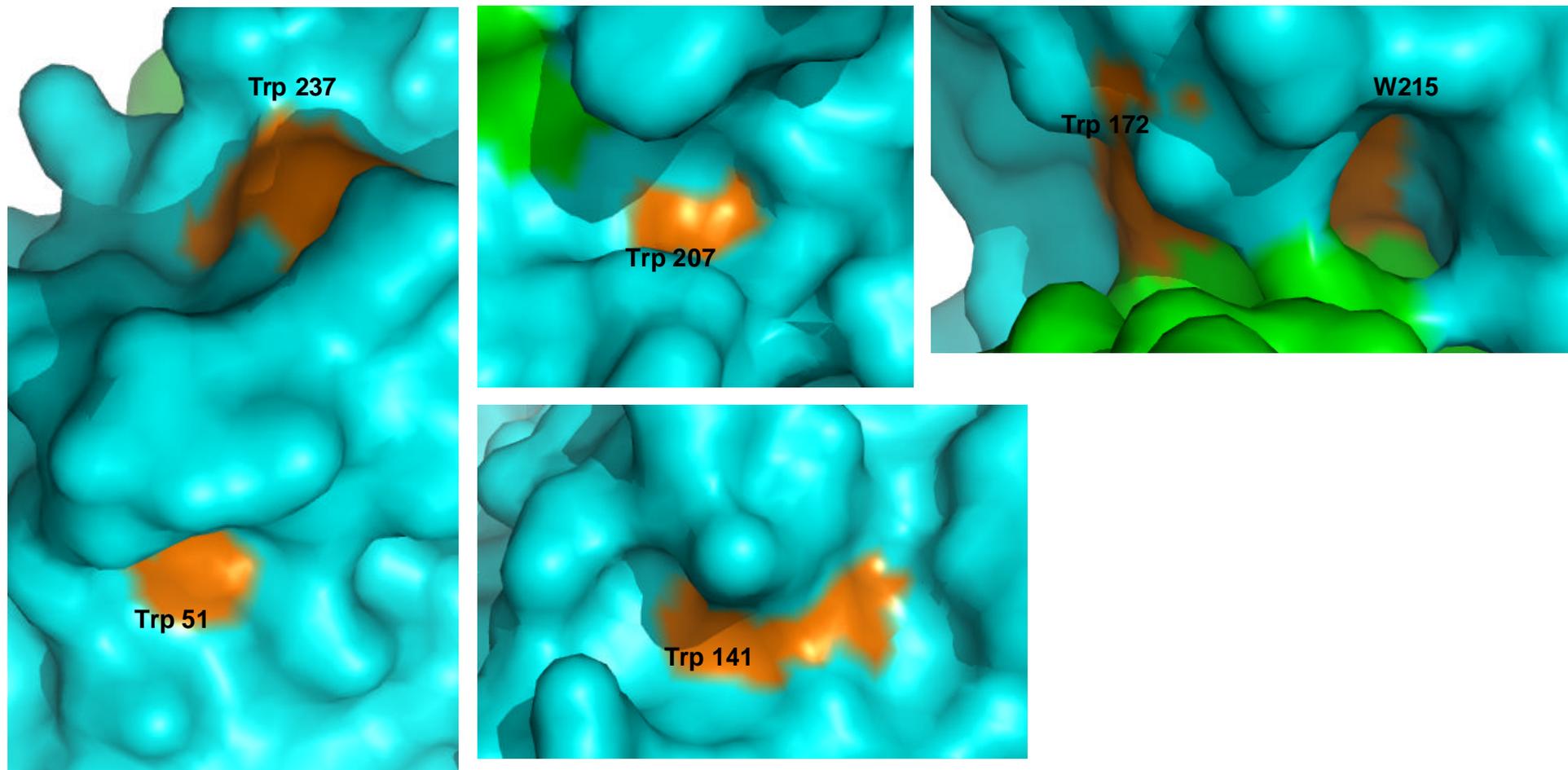
Os valores dos tempos de vida obtidos para o complexo binário com a quimotripsina foram de 0,839 ns e 4,050 ns, o que significa que toda a população de triptofanos formada pelo único triptofano do BTCl e pelos 8 triptofanos da quimotripsina se comportam de maneira diferente devido ao ambiente e estado conformacional. O tempo de vida longo corresponde à população de triptofanos expostos e o tempo de vida curto corresponde à população enterrada. Mais de 70% da fluorescência provém dos triptofanos que estão no estado exposto, apresentando o tempo de vida mais longo. A partir das diferenças nas posições dos triptofanos é possível analisar se alterações significativas ocorrem durante a formação do complexo.

Segundo Desie et. al., (1986) a alfa-quimotripsina é um exemplo de proteína em que os 8 triptofanos podem ser divididos em três grupos distintos: Trp172 e Trp215 localizados perto da superfície da enzima,

parcialmente expostos, os Trp29, Trp51, Trp 141, Trp 207 e Trp 237 que estão expostos na superfície da enzima e os Trp 27 e Trp 29 que estão enterrados no núcleo da proteína. Esses três grupos apresentam três tempos de vida distintos: 4,206, 1,375 e 0,132 ns, respectivamente, e a contribuição da fluorescência corresponde a 70,5%, 24,2%, e 0,053% respectivamente.

Comparando os dados do complexo com o BTCl, encontramos a redução do número de componentes do tempo de vida para apenas dois. Podemos concluir a partir desses dados que o tempo de vida longo do BTCl, formado pelos triptofanos expostos, compreende o triptofano do BTCl mais os triptofanos 51, 141, 172, 207, 215 e 237 da enzima, representando 71,3% da contribuição de fluorescência. O componente de tempo de vida curto é formado pelos triptofanos enterrados da enzima (Trp27 e Trp29) representando 28% da fluorescência. É importante lembrar que a contribuição na fluorescência não é proporcional e não está diretamente ligada ao número de triptofanos, uma vez que podem ocorrer diferentes tipos de supressões devido ao microambiente de cada triptofano na molécula no estado excitado.

Essa análise pode ser comprovada a partir dos dados da estrutura tridimensional do complexo binário com quimotripsina, obtido por modelagem molecular (Freitas *et.al.*, 1997) (figura 34). Por ser um modelo obtido por modelagem molecular, as águas cristalográficas não estão presentes impossibilitando, portanto a visualização da interação com o solvente. Como o RMSD da sobreposição do modelo do complexo binário obtido por modelagem com o modelo do complexo ternário foi de 0,67. Isso indica que as duas estruturas, apesar de estarem representando dois complexos diferentes, são semelhantes. Por essa razão a acessibilidade dos triptofanos ao solvente será observada no próximo tópico, considerando o complexo ternário obtido por difração de raios X.



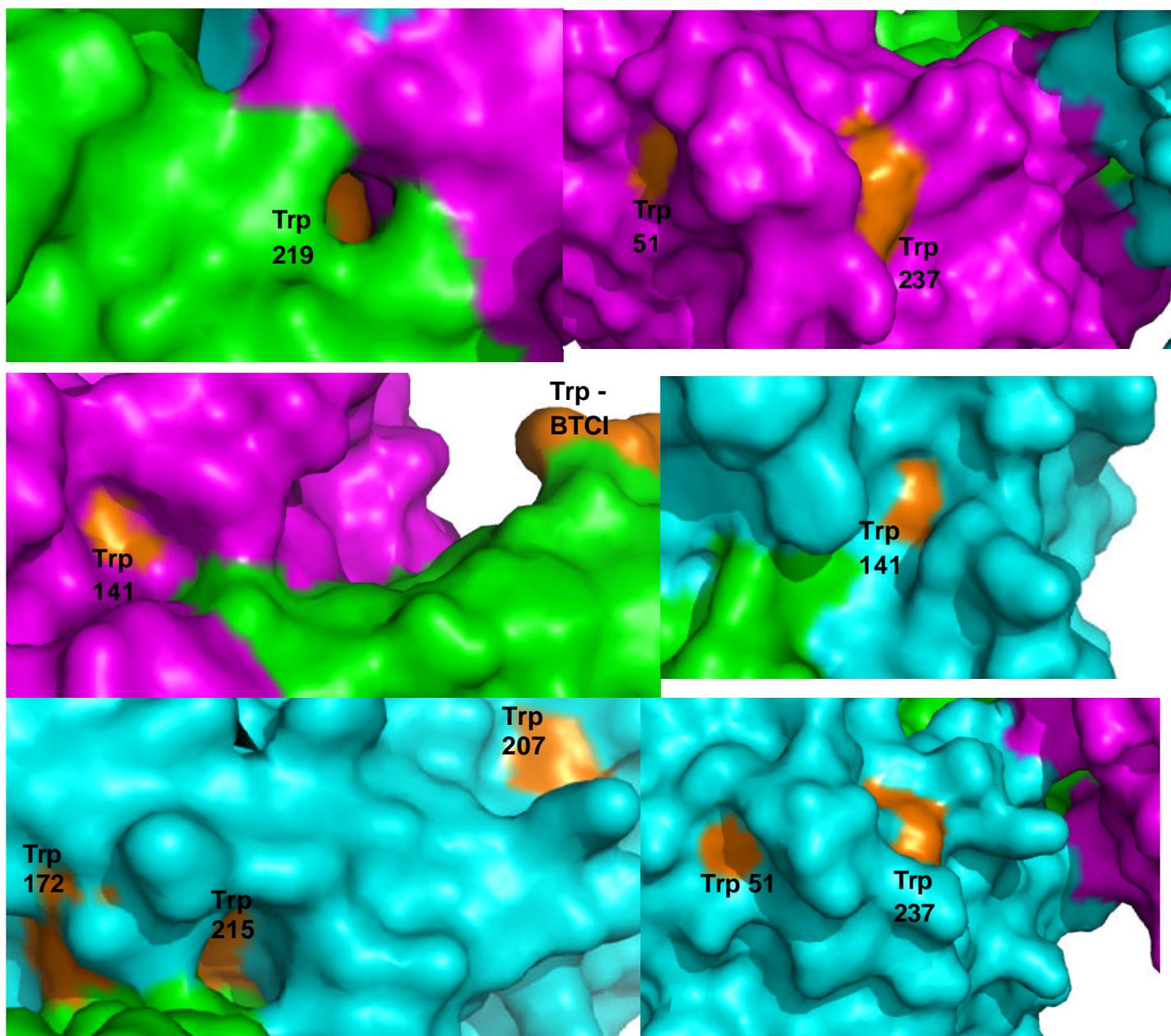
**Figura 34.** Representação do complexo binário com o BTCl (verde) e a quimotripsina (ciano) com os triptofanos (51, 141, 172, 207, 215 e 237) da enzima coloridos em laranja, evidenciados na superfície da molécula (PDB de Freitas *et.al.*, 1997).

### 5.12.3 Complexo ternário

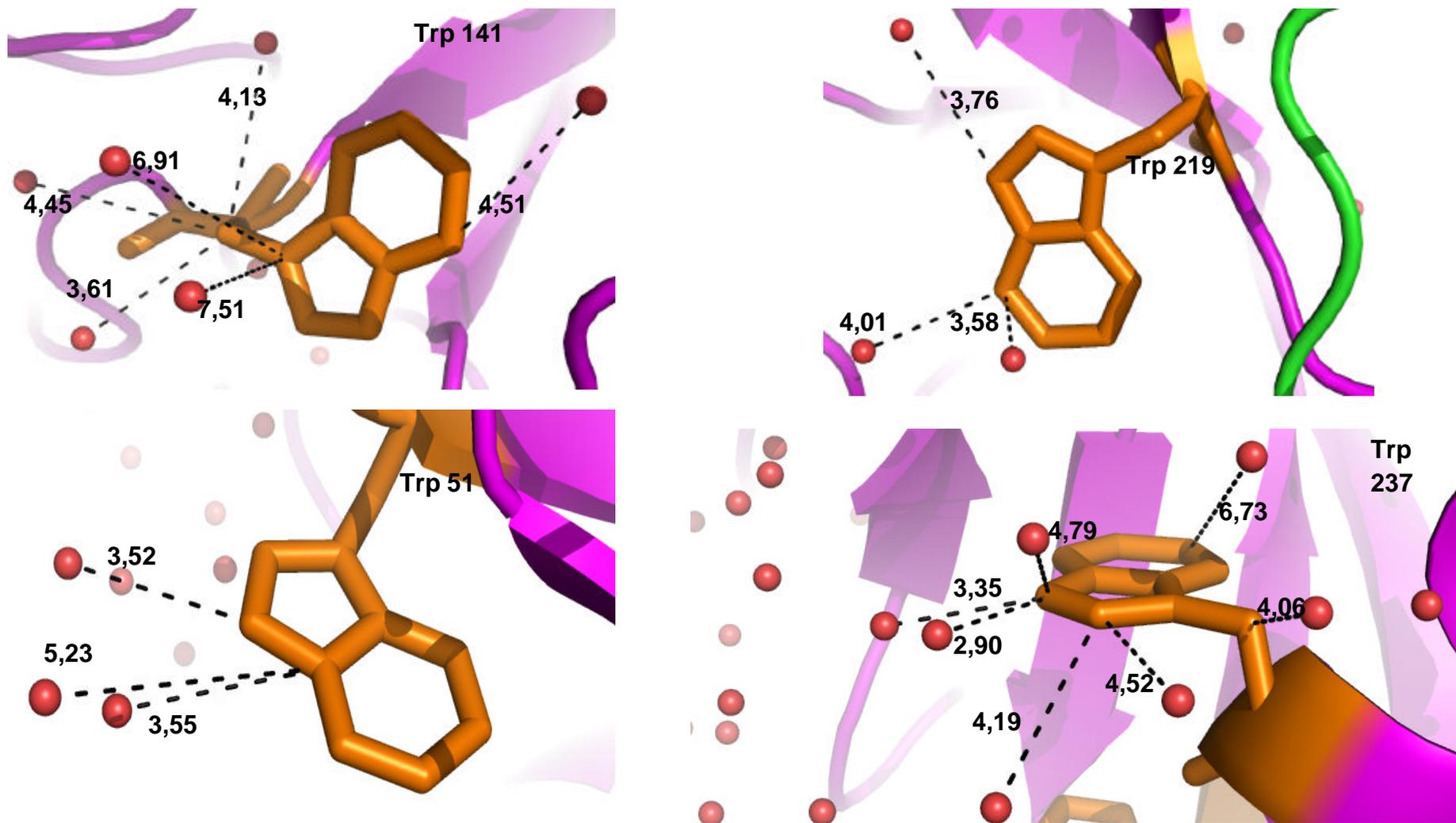
Para o complexo ternário embora valores menores de  $\chi^2$  tenham sido obtidos para dois tempos de vida, o melhor ajuste foi a distribuição bimodal do tipo Discreto. Os valores dos tempos de vida obtidos para o complexo ternário foram de 1,05 ns e 3,76 ns, o que significa que todos os triptofanos (13 no total) estão localizados em ambientes distintos ou interagindo de forma diferenciada com o solvente.

Conforme observação das frações que representam os valores dos tempos de vida, a contribuição de fluorescência provém igualmente dos resíduos expostos e enterrados. Analisando a estrutura tridimensional do complexo ternário (figura 35, 36 e 37) observamos que o conjunto formado pelos 13 triptofanos, sendo 4 da tripsina, localizados todos na superfície da enzima, e 8 da quimotripsina, além do triptofano do BTCl, pode ser classificado em dois grupos diferentes: os mais acessíveis ao solvente, localizados na superfície das proteínas, e o grupo dos triptofanos mais enterrados, com pouco ou nenhum acesso ao solvente. O primeiro grupo é composto de 11 resíduos: o triptofano do BTCl, os pertencentes à tripsina e os triptofanos 51, 141, 172, 207, 215 e 237 da quimotripsina. Os demais triptofanos enterrados seriam os outros dois restantes da quimotripsina. O decaimento de fluorescência para esses dois grupos é heterogêneo, indicando que os triptofanos do complexo ternário estão em dois grupos diferentes, um em ambientes mais acessíveis e outro mais enterrado.

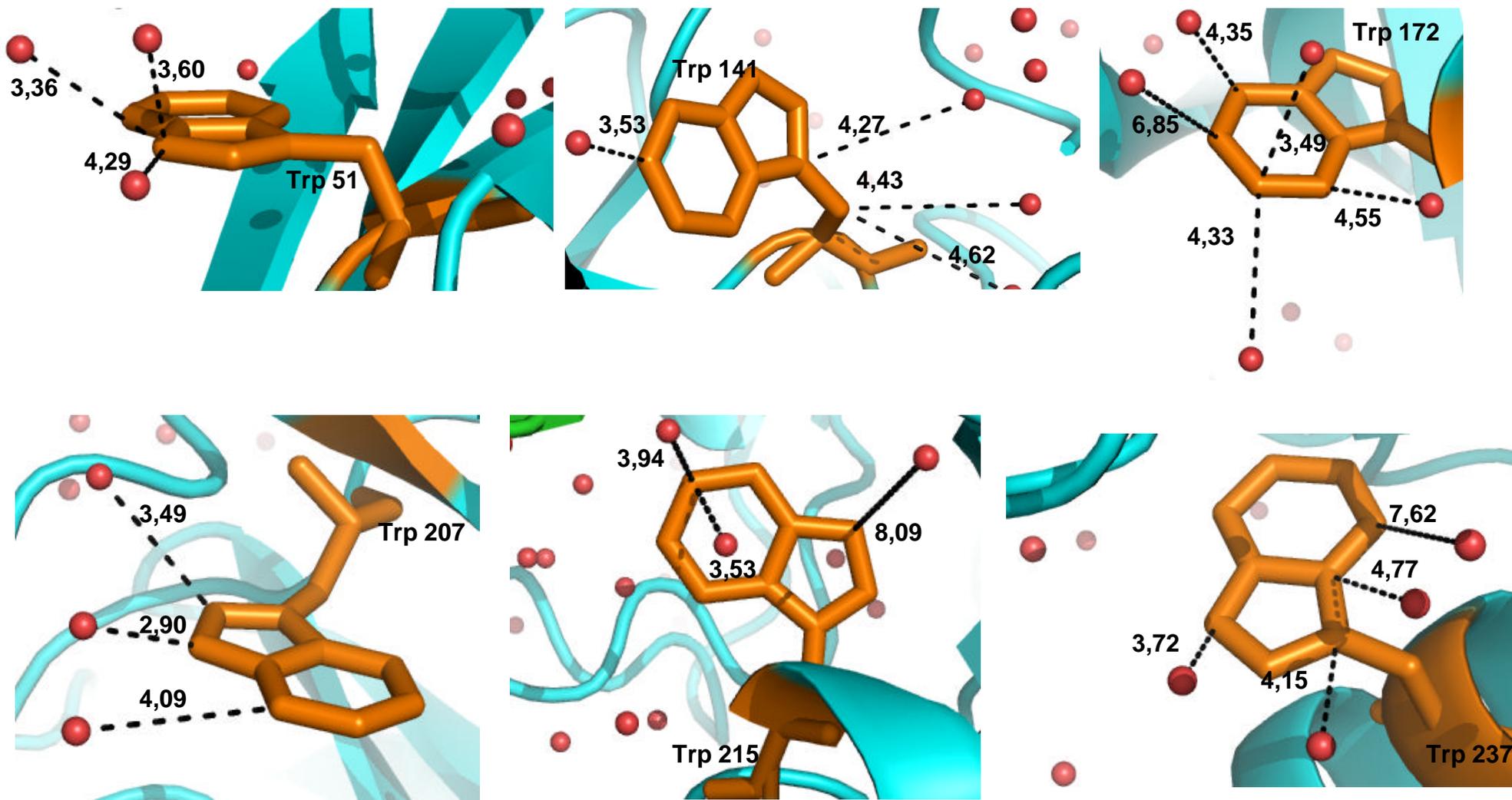
As alterações dos ambientes estruturais dos triptofanos indicam indiretamente mudanças conformacionais que ocorrem nas proteínas. Os triptofanos funcionam, portanto, como sondas que permitem analisar a dinâmica dessas moléculas, principalmente na formação dos complexos macromoleculares.



**Figura 35.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos coloridos em laranja, evidenciados na superfície da molécula ou parcialmente enterrados.



**Figura 36.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos da tripsina coloridos em laranja, evidenciando sua exposição ao solvente.



**Figura 37.** Representação do complexo ternário do BTCI (verde) com a quimotripsina (ciano) e a tripsina (magenta) com os triptofanos da quimotripsina coloridos em laranja, evidenciando sua exposição ao solvente.

#### 5.12.4 BTCI livre

O BTCI apresentou decaimento de fluorescência complexo. Os ajustes para um tempo de vida foram inadequados, como indicado pelo alto valor de  $\chi^2$ . Os melhores ajustes foram para dois tempos de vida em todos os modelos observados, sendo os modelos *Discreto* e *Planck* aqueles que apresentaram valores mais baixos de  $\chi^2$ , e o discreto o melhor ajuste. A complexidade do decaimento observado provavelmente reflete na heterogeneidade das conformações da proteína, o que sugere que este componente, um único triptofano, pode apresentar-se em diferentes estados conformacionais.

O triptofano do BTCI é o resíduo de número 82, de um total de 83 resíduos de aminoácidos. Sua visualização não foi possível no modelo de estrutura tridimensional, porque ele está localizado em uma região que não foi resolvida por difração de raios X, devido à ausência de densidade eletrônica. Os átomos localizados nessa região apresentam liberdade conformacional e não estão organizados em estrutura secundária definida. Especialmente, a partir do resíduo 69, seguinte à última ligação dissulfeto até o final do C-terminal, a proteína apresenta maior liberdade conformacional, uma vez que nenhuma ligação dissulfeto, capaz de manter a rigidez da estrutura protéica, ocorre nessa região.

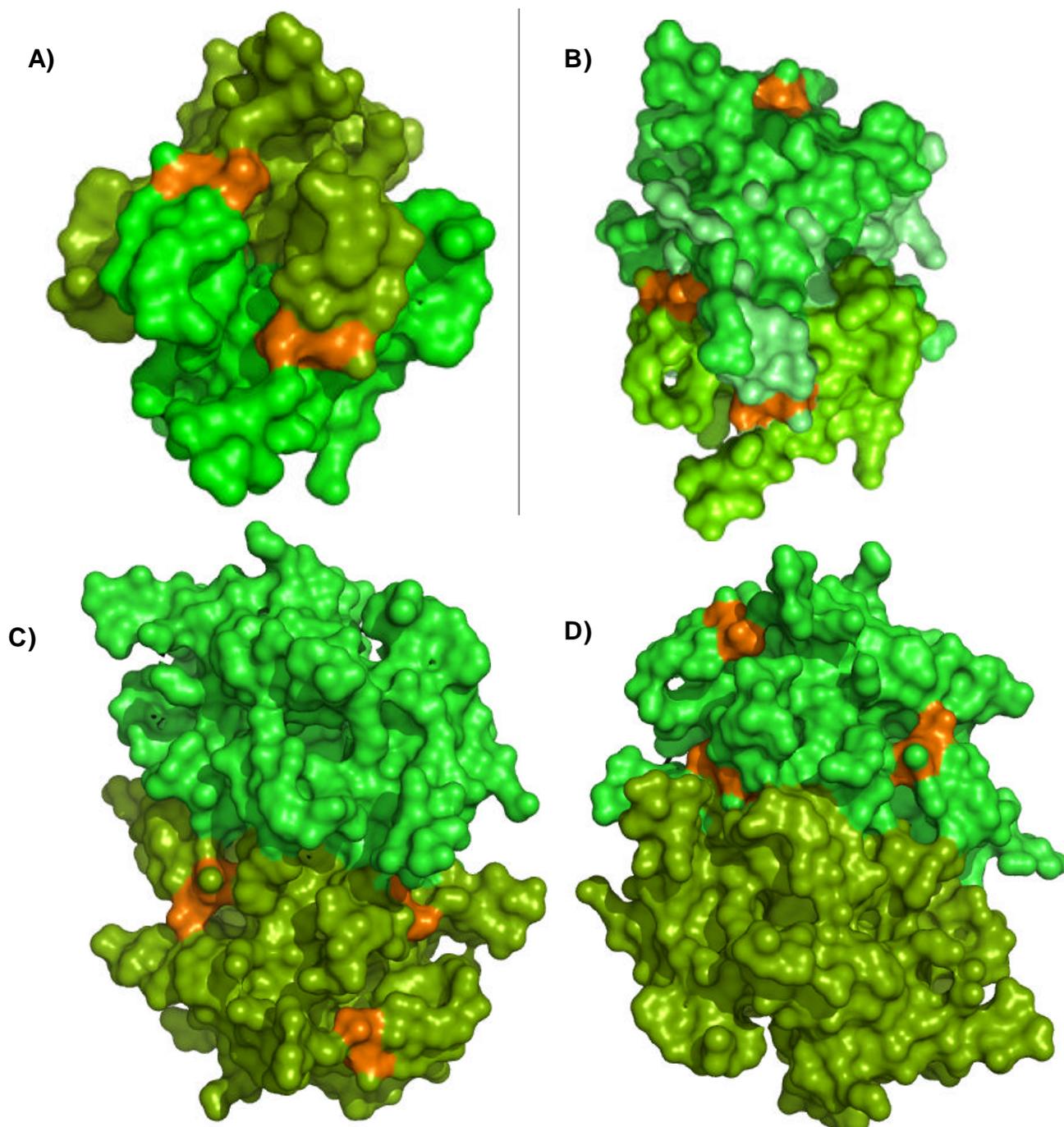
Os dados dos tempos de vida de fluorescência obtidos para as proteínas possibilitam uma análise, no nível atômico, do tipo de ambiente molecular ao qual pertencem os fluoróforos de uma macromolécula, especialmente os triptofanos, além de fornecer informações importantes sobre modificações desse ambiente devido às mudanças nas condições do meio provocadas por agentes externos ou por novas interações entre cadeias laterais adjacentes ao fluoróforo.

Conforme Lakowicz (1999) e Bismuto *et. al.*(1999), resíduos de triptofanos enterrados e expostos ao solvente apresentam tempos de vida

curto e longo, respectivamente. Mas o decaimento bi-exponencial atribuído ao BTCl, representado pelos dois tempos de vida encontrados, não são atribuídos a populações distintas de triptofano, uma vez que esta proteína possui somente um único triptofano (Morhy e Ventura, 1987). Essa característica é atribuída às formas dinâmicas conformacionais desse fluoróforo que ocorrem durante o estado excitado.

Szabo e Rayner (1980) mostraram, em estudo de fluorescência dinâmica de triptofanos e seus derivados em solução aquosa, que os decaimentos desses fluoróforos são descritos como modelos bimodais, apresentando tempos de vida de 3,1 ns e 0,5 ns, em pH 7,0. Estes valores são bastante próximos aos valores encontrados para o BTCl em pH 7,0. No estudo de Szabo e Rayner (1980) em todos os derivados do grupo indol foi encontrado apenas um único tempo de vida, enquanto que o triptofano e seus derivativos apresentaram dois tempos de vida. O comportamento bi-exponencial dos triptofanos é dependente dos substituintes do carbono alfa e da cadeia lateral, devido à diferença na eficiência de supressão da fluorescência do grupo indol pelos substituintes.

A formação de dímeros ou oligômeros entre as moléculas de BTCl também pode estar relacionada com a existência de dois tempos de vida. Estudos de microscopia de força atômica e análises computacionais (Silva et. al., 2005), espalhamento de luz (Ventura et. al, 1981) mostraram a auto-associação do BTCl em equilíbrio dinâmico entre a formação de monômeros-dímeros-trímeros e hexâmeros. Além disso, Rao e Suresh (2007) cristalizaram e resolveram a estrutura tridimensional de uma isoforma do BTCl, na forma de um dímero. Como mostra a figura 38, mesmo com a formação de oligômeros do BTCl, o enterramento dos triptofanos não foi observado. Nos oligômeros do BTCl, os diferentes triptofanos estão expostos, mas podem apresentar estados conformacionais diferentes no estado excitado.



**Figura 38.** Superfície molecular dos oligômeros formados pelo BTCI em dímero (A), trímero (B) e hexâmero (C, D) com a região do triptofano colorida em laranja, evidenciando sua localização na superfície da molécula (Modelos de Silva *et. al.*, 2005).

Os dados obtidos da auto associação do BTCl e os resultados apresentados nesse trabalho indicaram que os triptofanos nos oligômeros apresentam predominantemente padrões semelhantes de decaimento de fluorescência (tempo de vida de aproximadamente 5 ns), compatíveis com triptofanos expostos ao solvente (Lakowicz, 1999). No entanto, tempos de vida menores foram também observados para o BTCl na forma monomérica, o que indica que esse decaimento bi-exponencial está relacionado à existência de subestados conformacionais no estado excitado.

Um único triptofano pode apresentar decaimentos de fluorescência complexo devido à heterogeneidade conformacional das formas moleculares no estado excitado e do movimento atômico nas proteínas (Ferreira *et. al.*, 1994, Frauenfelder e Gratton, 1986, Beechem e Brand, 1985, Grinvald e Steinberg, 1976, Royer, *et. al.*, 1990). Alcalá *et. al.* (1987) mostraram que proteínas com um único triptofano apresentaram distribuições de tempos de vidas associados a vários subestados conformacionais. De acordo com este modelo, o número de diferentes microambientes ocupados pelos resíduos de triptofano durante o tempo de vida no estado excitado, bem como a taxa de interconversão entre os subestados conformacionais, afetam o decaimento de fluorescência. Além disso, a viscosidade, temperatura e pH afetam essa interconversão (Beece *et al.*, 1980; Ferreira *et al*, 1994).

Com o objetivo de analisar as mudanças conformacionais do BTCl, principalmente nas regiões próximas ao triptofano, medidas do tempo de vida foram realizadas em pH variando de 4-10, considerando-se que poucas informações puderam ser obtidas nessa região, utilizando a técnica de cristalografia de raios X. Nenhuma alteração significativa nos valores de tempo de vida medidos (~5 ns) nessa faixa de pH foi encontrada, o que indica que a região estrutural onde está o único triptofano do BTCl não sofre alterações

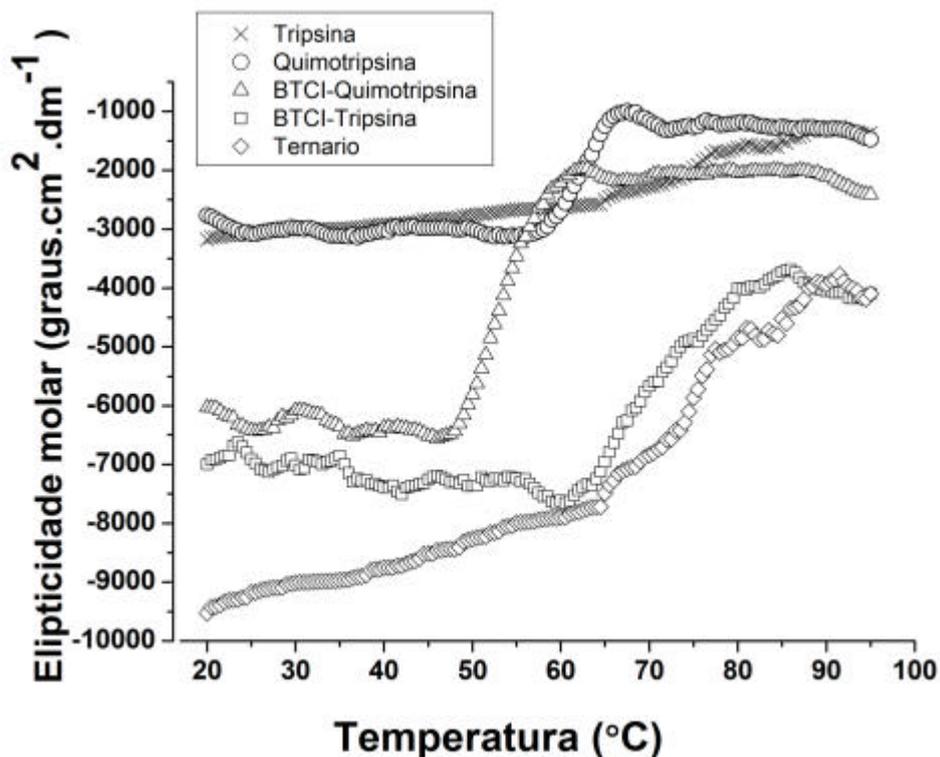
conformacionais sob ação de diferentes pHs. No entanto, poucas mudanças foram observadas em temperaturas mais baixas, e essas mudanças são decorrentes dos diferentes subestados conformacionais do BTCI nessa condição. Esses dados corroboram com os previamente descritos, onde foi mostrado que o BTCI mantém sua estrutura preservada e apresenta a mesma atividade inibitória independente do pH do meio (Silva *et. al.*, 2000).

O triptofano do BTCI está afastado da região de interface nos modelos associação oligomérica e nos modelos binário e ternário (com as enzimas tripsina e quimotripsina) e não pôde ser visualizado com a técnica de cristalografia. Os dados obtidos pelo experimento de fluorescência dinâmica foram fundamentais para avaliar o ambiente conformacional deste triptofano e analisar se ocorrem alterações conformacionais, monitoradas pela diferença na acessibilidade do triptofano ao solvente, para o BTCI livre e em complexo com as enzimas tripsina e quimotripsina. Essas informações só puderam ser acessadas com essa técnica de fluorescência dinâmica.

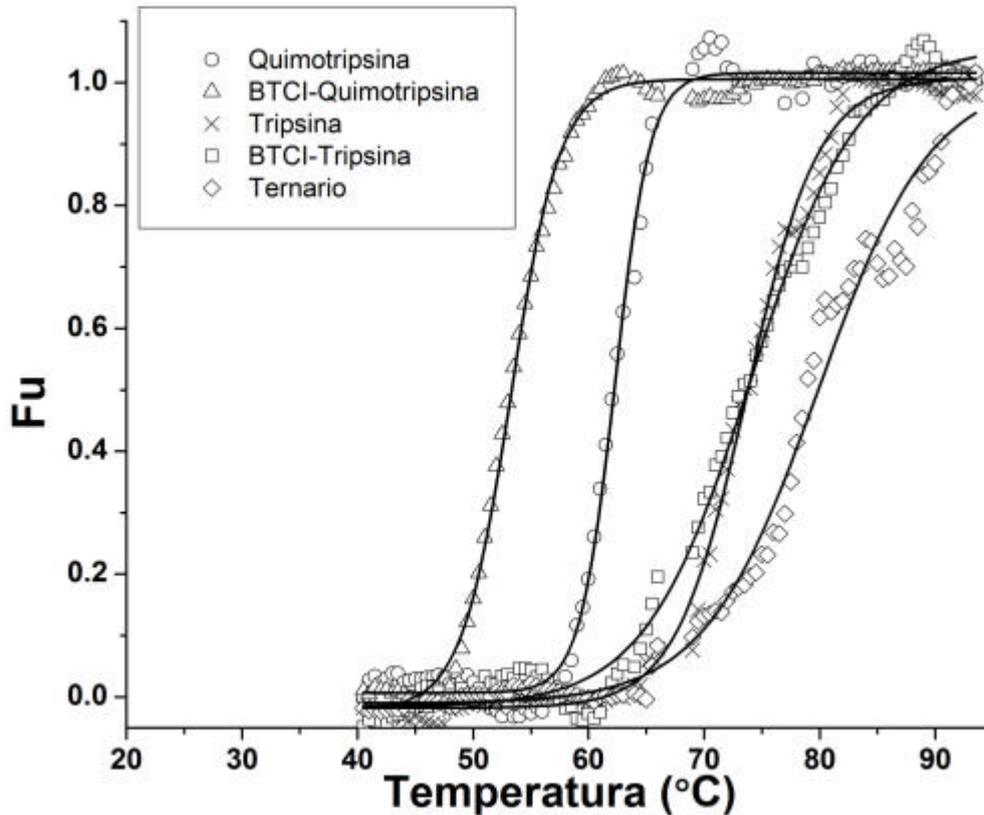
Em conclusão, a fluorescência dinâmica e a cristalografia de raios-X permitiram analisar detalhes das estruturas protéicas em diferentes ambientes definidos pelo solvente e mudanças conformacionais que ocorrem durante a formação de complexos do BTCI com as enzimas o que é fundamental para o entendimento da função biológica dessas proteínas nos organismos vivos onde elas atuam.

### 5.13 Dicroísmo circular

A fim de investigar a estabilidade dos complexos formados pela  $\beta$ -tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina com o BTCl, foram realizados os experimentos de desnaturação térmica utilizando a técnica de dicroísmo circular na faixa distante do ultra violeta (190–260 nm). Os valores das elipticidades na faixa de temperatura de 25-95°C medidas em 208 nm, correspondentes a uma das bandas dicróicas características para estruturas em  $\alpha$ -hélices, foram consideradas para a análise das estruturas secundárias e cálculo dos parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade térmica das proteínas.



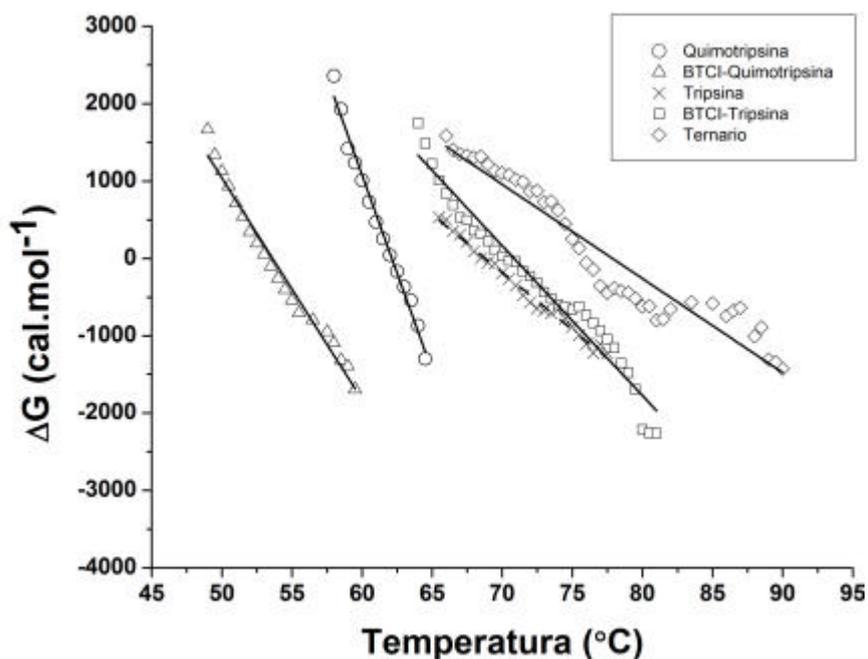
**Figura 39.** Curvas de desnaturação térmica das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCl em complexo binário com quimotripsina, com tripsina e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.



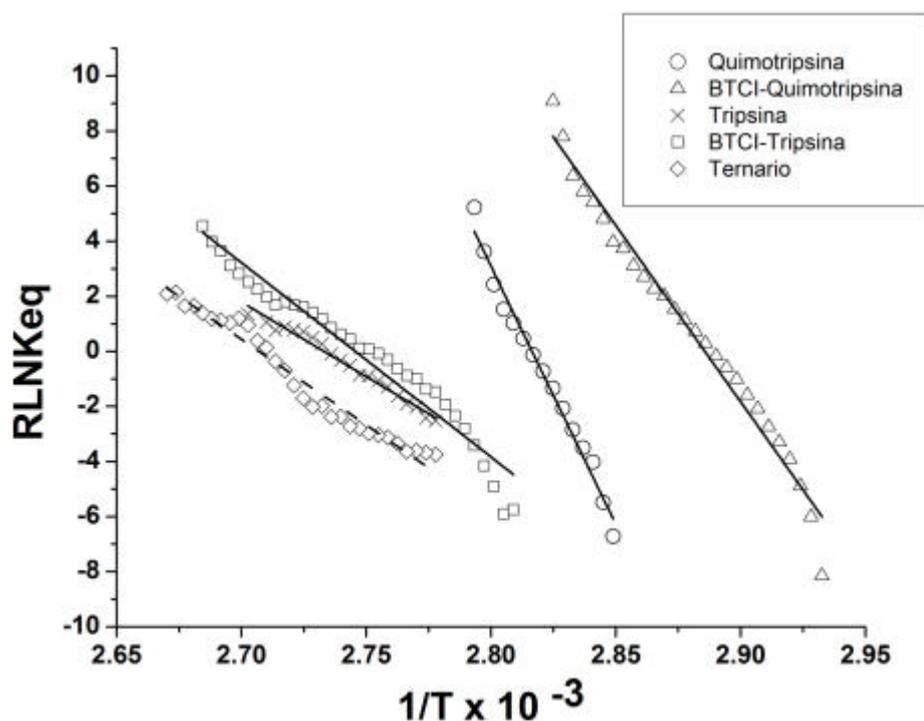
**Figura 40.** Fração desnaturada termicamente das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCl em complexo binário com quimotripsina, com tripsina e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

A figura 40 apresenta as curvas de transição térmica ajustadas segundo os valores das frações desnaturadas das proteínas estudadas. A partir desses dados foram obtidas as curvas da variação de energia livre com o aumento da temperatura. Os valores de  $T_m$  (figura 41), correspondentes ao ponto central das curvas de desnaturação quando  $\Delta G$  é igual a zero, foram calculados.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos das curvas de van't Hoff (figura 42) foram considerados para o cálculo da energia livre de Gibbs a 25°C ( $\Delta G^{25}$ ), que corresponde à estabilidade termodinâmica e estrutural da proteína. Todos os parâmetros termodinâmicos estão apresentados na tabela 14.



**Figura 41.** Variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) estimada a partir das curvas de desnaturação térmica das proteínas: tripsina, quimotripsina, BTCI em complexos binário com quimotripsina, tripsina, e complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.



**Figura 42.** Gráfico de Van't Hoff para a desnaturação térmica da tripsina, da quimotripsina e para o BTCI em complexos binário com quimotripsina, tripsina, complexo ternário com ambas as enzimas, em pH 7,0.

**Tabela 14.** Parâmetros termodinâmicos dos complexos com o BTCl calculados a partir das curvas de desnaturação térmica em tampão 2 mM HEPES pH 7,0.

	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>ΔH<sub>m</sub></b>	<b>ΔS<sub>m</sub></b>	<b>ΔG<sup>25</sup></b>
	(°C)	(kcal.mol <sup>-1</sup> )	(cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	(kcal.mol <sup>-1</sup> )
Quimotripsina	53,77	128,11± 2,79	369,69 ± 7,67	17,94
BTCl – Quimotripsina	62,04	166,90 ± 4,64	470,01 ± 8,73	26,83
Tripsina	70,45	60,32± 2,18	165,77± 5,93	10,92
BTCl - tripsina	71,17	80,19 ± 4,02	220,19 ± 9,59	14,57
Ternário	77,14	69,33 ± 1,73	132,55 ± 4,74	29,83

O valor de T<sub>m</sub> encontrado para a quimotripsina foi de 53,77°C em pH neutro, semelhante ao valor de 53,64°C encontrado por Diego *et. al.*, (2004) em água. Os valores de ΔH (128,11 kcal.mol<sup>-1</sup>) e ΔS (369,69 kcal.mol<sup>-1</sup>) são diferentes dos valores obtidos por Lee e Timashef (1981) para a quimotripsina em pH 3,0 (ΔH = 90 kcal.mol<sup>-1</sup> e ΔS = 280 cal.mol<sup>-1</sup>). Similarmente, o valor estimado nesse trabalho de ΔG de 17,94 kcal.mol<sup>-1</sup> em pH 7,0 (próximo ao pH ótimo da enzima) foi maior do que o estimado pelos referidos autores (7,96 kcal.mol<sup>-1</sup>) em pH 3,0. Isso indica que a estrutura tridimensional da quimotripsina é mais estável em pH 7,0 comparado com pH 3,0. Esses dados foram estimados para as curvas de desnaturação térmica segundo o modelo de dois estados, com os valores da elipticidade próximos de zero.

Para o complexo formado pelo BTCl com a quimotripsina, o valor de  $T_m$  foi de 62,04 °C, maior que o valor encontrado para a enzima na forma livre, indicando que a associação do inibidor estabiliza a enzima. De forma semelhante, o valor de  $\Delta G^{25}$  aumentou de 17,94 kcal.mol<sup>-1</sup> para 26,83 kcal.mol<sup>-1</sup>, reforçando o efeito estabilizador do inibidor na enzima. Os parâmetros termodinâmicos obtidos no presente trabalho indicaram a alta estabilidade térmica da quimotripsina na presença do inibidor, em concordância com a maioria das proteínas globulares termofílicas que apresentam valores de  $\Delta G^{25}$  acima de 10 kcal.mol<sup>-1</sup> (Kumar *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2001). Efeitos semelhantes de estabilização da quimotripsina foram observados após a complexação da enzima com polímero de colesterol (Nishikawa *et al.*, 1994), com preservação da estrutura até a temperatura de 80°C.

O processo de desnaturação térmica da tripsina ocorreu de forma semelhante ao da quimotripsina, com desnaturação completa da enzima até a temperatura de aproximadamente 80°C. O valor de  $T_m$  encontrado em pH neutro foi de 70,45°C próximo ao valor de 72,3°C encontrado por Donovan e Beardslee (1974) para a  $\beta$ -tripsina em pH 6,7. O valor de  $\Delta G^{25}$  calculado foi de 10,92 kcal.mol<sup>-1</sup>.

A formação do complexo do BTCl com a tripsina alterou em parte a estabilidade da enzima, indicado pela variação do valor de  $T_m$  de 70,45°C para a tripsina livre e de 71,17 °C para o complexo. O valor estimado para o  $\Delta G^{25}$  foi de 14,57 kcal.mol<sup>-1</sup>, próximo daquele estimado para a tripsina livre (10,92 kcal.mol<sup>-1</sup>), e, provavelmente, correspondeu ao estágio intermediário desse processo de desnaturação, principalmente da enzima.

O processo de desnaturação do complexo ternário não ocorreu completamente, como indicado pelos valores da elipticidade molar (aproximadamente - 4.000 graus.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>) até 95°C. O valor de

$T_m$  de 77,14 °C, maior que os valores encontrados para os complexos binários, e  $\Delta G^{25}$  de 29,83 kcal.mol<sup>-1</sup>, corresponderam provavelmente à desnaturação das enzimas somente ou mudanças conformacionais nas proteínas envolvidas. Na formação do complexo ternário o efeito de estabilização das enzimas foi superior ao comparado ao efeito causado na formação dos complexos binários. O processo de desdobramento de proteínas diméricas, quando ocorre em uma única transição, resulta em valores de  $\Delta G^{25}$  no intervalo de 10-27 kcal.mol<sup>-1</sup>, que é significativamente maior do que a estabilidade conformacional encontrada para proteínas monoméricas (5-15 kcal.mol<sup>-1</sup>; Neet e Timm, 1994; Pace *et. al*, 1997). O valor encontrado para o complexo ternário do BTCI está acima deste intervalo, confirmando a estabilidade do complexo, mesmo considerando o processo de desdobramento das proteínas de mais de dois estados.

A magnitude da estabilidade conformacional está relacionada com o tamanho da proteína, do número de subunidades e é dependente do tipo de interação na interface da estrutura de complexos ou estruturas oligoméricas (Neet e Timm, 1994). O complexo ternário é resultante da interação entre as enzimas tripsina e quimotripsina com o BTCI e apresenta as duas interfaces distintas de interação. Os parâmetros termodinâmicos estimados para os complexos binário e o ternário, mostraram que as interações iônicas presentes na interface da tripsina apresentam um efeito de estabilização mais pronunciado que as interações hidrofóbicas presentes na interface da quimotripsina.

A associação do BTCI com a tripsina é diferente da associação com a quimotripsina. A constante de associação da quimotripsina com o BTCI está em torno de 0,32 a  $1,36 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> (Freitas *et. al*, 1999) - dependentes da temperatura, enquanto que para a tripsina na mesma faixa de temperatura e pH os valores variam de 1,5 a

$3,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  (Fachetti *et. al.*, 1984). No BTCI o sítio antitriptico apresenta predominância de contatos hidrofílicos, com a presença de várias ligações de hidrogênio e menor rigidez conformacional. Em contraste, o sítio reativo para a quimotripsina há predominância de contatos hidrofóbicos e maior flexibilidade conformacional. Essas diferenças estruturais são determinantes para a maior afinidade do BTCI para a tripsina e, provavelmente para as diferenças na estabilidade estrutural dos complexos binários e do ternário formados pelo BTCI com as respectivas enzimas.

Inibidores da família BBI são conhecidos por sua estabilidade a altas temperaturas conferidas pela presença de ligações dissulfeto. Apesar disso, poucos dados quantitativos que caracterizam essa estabilidade são encontrados na literatura, excetuando um único artigo (Donovan e Beardslee, 1974) que discute a estabilidade térmica de complexo de inibidores com suas enzimas alvo, apenas com os valores da temperatura de transição entre o estado nativo e desnaturado, como foi comparado com os dados aqui apresentados e discutidos acima.

Experimentos realizados com o inibidor Bowman-Birk WSTI, mostraram que o inibidor manteve atividade mesmo após permanecer por uma hora a  $90^\circ\text{C}$  (Deshimaru *et. al.*, 2002). De forma semelhante, o inibidor BBI manteve mais de 60% da atividade anti-tríptica após 3 horas de exposição a  $100^\circ\text{C}$ , em pH neutro (Osman *et. al.*, 2002). Similarmente, o BTCI apresenta estabilidade conformacional, mantendo sua atividade inibitória mesmo após a exposição a temperaturas de  $95^\circ\text{C}$  durante uma hora (Silva *et. al.*, 2001). Ensaios de desnaturação térmica utilizando o CD e microcalorimetria de varredura (DSC) indicaram que esta molécula não desnatura, mesmo em temperaturas elevadas atingidas no

microcalorímetro (dados não mostrados). Esta estabilidade é devida em grande parte a presença das sete ligações dissulfeto no BTCl.

Devido à estabilidade atribuída às ligações dissulfeto dos inibidores da família Bowman-Birk, as medidas de parâmetros que caracterizam a estabilidade térmica da proteína são difíceis de serem obtidas, sendo necessária a realização de experimentos em condições que possibilitem a redução dessas ligações. Experimentos de desnaturação térmica com o feijão tepari (*Phaseolus acutifolius*) só foram possíveis com as ligações dissulfeto reduzidas (Osman *et. al.*, 2002). Inibidores da família Kunitz – tipo STI, que apresentam somente duas ligações dissulfeto, desnaturam na faixa que varia de 60 a 70°C (Baugh e Trowbridge, 1972; Fan *et. al.*, 2007; Pouvreau *et. al.*, 2005; Roychaudhuri *et. al.*, 2003; Yoshizaki *et. al.*, 2007). Esses dados são comparáveis aos ensaios de desnaturação térmica dos complexos binários e ternário do BTCl.

Como indicado pela figura 39, o processo de desnaturação das proteínas na forma livre ocorreu em dois estados, mas foi incompleto para os complexos BTCl-tripsina e o ternário. Esse resultado ocorreu devido principalmente à taxa lenta de dissociação do BTCl dos complexos; a permanência do BTCl no sítio ativo da enzima, mesmo após ação catalítica; e a estabilidade do BTCl devido à presença de sete ligações dissulfeto. Esses dados mostram que a associação do BTCl com as enzimas aumenta a estabilidade dessas proteínas nos complexos.

O processo de desnaturação de proteínas oligoméricas ou em complexos macromoleculares tende a ocorrer de diferentes formas: a) as proteínas podem se dissociar e então desnaturar; b) podem sofrer desnaturação enquanto complexadas, e posteriormente se dissociarem; c) ou uma das proteínas – a menos estável - pode se desnaturar em complexo, se dissociar, e depois a proteína mais

estável sofre desnaturação (Donovan e Beardslee, 1974; Neet e Timm, 1994). Muitas proteínas monoméricas e diméricas desnaturam de acordo com o modelo de dois estados (Pace *et. al*, 1997), enquanto outros apresentam intermediários estáveis no processo. Em proteínas oligoméricas, o processo de desnaturação pode ocorrer em vários estados, sendo que o primeiro corresponde, geralmente, à dissociação das subunidades, mantendo a estrutura dos monômeros. Posteriormente, ocorre a desnaturação com o desdobramento de todas as cadeias que formam o oligômero (Kirschner e Tanford, 1964; Neet e Timm, 1994).

Segundo Donovan e Beardslee (1974) a determinação do modelo que melhor descreve o processo de desnaturação de complexos formados com inibidores de proteases, principalmente os membros da família Bowman-Birk, é de difícil escolha. Isso é justificado pelo fato de que o processo de dissociação do inibidor com a enzima é lento ou nem ocorre devido à restrição conformacional definida por uma ligação dissulfeto no sitio reativo. Além disso, a presença das sete ligações dissulfeto no inibidor restringe a liberdade conformacional da molécula e dificulta o processo de desdobramento da estrutura tridimensional. No entanto, para os inibidores do tipo Kunitz, que apresentam menor número de ligações dissulfeto, os complexos podem ser desnaturados seguindo modelos de dois ou mais estados. Para o complexo STI-tripsina, um exemplo de inibidor do tipo Kunitz, o modelo mais adequado foi aquele de dois estados com a desnaturação do complexo sem a formação de intermediários (Donovan e Beardslee, 1974).

O dicróismo circular, na faixa de comprimento de onda estudada, permite acompanhar mudanças conformacionais no nível das estruturas secundárias de proteínas. No entanto, o desaparecimento das bandas dicróicas com a diminuição da

elipiticidade para próximo de zero, dependentes da temperatura, indica que a proteína desnatura nessas condições. Nesse trabalho, as curvas de desnaturação térmica mostram que o sinal dicróico permaneceu abaixo de  $-1500 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  para as enzimas livres,  $-2500 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  para o complexo BTCl-quimotripsina e aproximadamente  $-4000 \text{ graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  no final da transição ( $95^\circ\text{C}$ ) para o complexo BTCl-Tripsina e o complexo ternário. Esses últimos dados indicam que parte da estrutura desses dois complexos pode estar preservada, provavelmente devido a estrutura rígida do BTCl definida pelas sete ligações dissulfeto. Para o complexo BTCl-quimotripsina, a desnaturação também não foi total. No entanto, diferente do complexo binário com a tripsina, essa molécula apresentou intermediários muito mais modificados estruturalmente, decorrentes da ruptura de maior número de interações que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas, o que está indicado pelos valores da entalpia e entropia apresentados na tabela 14. Para analisar o processo de desdobramento dessas moléculas outros experimentos que associem outros agentes desnaturantes com a temperatura e outras técnicas, como a microcalorimetria, desnaturação dos complexos com as ligações dissulfeto parcialmente ou totalmente reduzidas, precisam ser realizados.

Para aplicações biotecnológicas de enzimas e inibidores é fundamental que os complexos entre essas proteínas permaneçam estáveis e associadas, garantindo o efeito prolongado da inibição das enzimas alvo. Algumas dessas ações, no caso dos inibidores da família a qual pertence o BTCl, podem ser a aplicação terapêutica contra diversas doenças como a esclerose múltipla; a ação anticarcinogênica e a utilização de inibidores no controle biológico de pragas.

## 7 CONCLUSÃO

- A estrutura tridimensional cristalográfica do BTCI foi resolvida em complexo binário com a tripsina. Esta estrutura é a de maior resolução desta família já depositado no PDB.
- A estrutura tridimensional cristalográfica do BTCI foi resolvida em complexo ternário com a tripsina e a quimotripsina. Esta é a única estrutura de um inibidor Bowman-Birk associados a quimotripsina e tripsina simultaneamente e será a primeira estrutura dessa família de inibidores em complexo com a quimotripsina a ser depositada no PDB.
- A estrutura tridimensional cristalográfica do BTCI em complexo ternário foi resolvida em pH neutro e ácido, e mostrou que não há diferenças significativas na estrutura tridimensional dependes desses pHs.
- Ocorrem poucas modificações na estrutura tridimensional durante a formação dos complexos, sendo a maioria delas localizadas nas enzimas e na interface entre as proteínas.
- As alterações conformacionais do complexo binário do BTCI com a tripsina ocorrem principalmente na região da interface entre as duas proteínas, indicadas pela modificação do ambiente dos triptofanos nessa região.
- Alterações conformacionais na interface do complexo binário entre o BTCI e a quimotripsina não foram evidentes, indicadas pela preservação da acessibilidade dos triptofanos ao solvente.
- O BTCI não apresentou diferenças conformacionais nos diferentes pHs.

- O processo de desnaturação dos complexos formados pelo BTCI e as enzimas não seguem o modelo de dois estados, sendo o um dos estágios do desdobraimento correspondente ao desdobraimento inicial das enzimas, com preservação do BTCI associado às mesmas.
- A formação dos complexos binários e o ternário promoveram estabilização das proteínas, indicadas pelo aumento das temperaturas de transição durante o desdobraimento das proteínas e pelos altos valores de  $\Delta G^{25}$  estimados para os complexos comparados às proteínas livres.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcala, J. R.; Gratton, E.; Prendergast, F. G.. **Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry.** Biophysical Journal 1987, 51 (4), 587-596.

Alvizo, O.; Allen, B.D.; Mayo, S.L.. **Computational protein design promises to revolutionize protein engineering.** Biotechniques 2007 Jan; 42(1):31, 33, 35

Aragao, J. B.; Ventura, M. M.. **An infrared spectroscopic study on the secondary structure of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor - amide-i-iii and amide-v bands.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1986, 58 (3), 339-343.

Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Bolognesi, M.; Spallarossa, A.; Coletta, M.; De Cristofaro, R.; Menegatti, E.. **The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor: A milestone protein.** Current Protein & Peptide Science 2003, 4 (3), 231-251.

Baek, J. M.; Song, J. C.; Choi, Y. D.; Kim, S. I.. **Nucleotide-sequence homology of cdnas encoding soybean bowman-birk type proteinase-inhibitor and its isoinhibitors.** Bioscience Biotechnology and Biochemistry 1994, 58 (5), 843-846.

Barbosa, J.; Silva, L. P.; Teles, R. C. L.; Esteves, G. F.; Azevedo, R. B.; Ventura, M. M.; de Freitas, S. M.. **Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from Vigna unguiculata seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 angstrom resolution and its structural properties in association with proteinases.** Biophysical Journal 2007, 92 (5), 1638-1650.

Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.. **Evolutionary lines of cysteine peptidases.** Biol Chem. 2001 May;382(5):727-33.

Baugh, R.J.; Trowbridge, C.G.. **Calorimetry of some trypsin-trypsin inhibitor reactions.** J Biol Chem. 1972 Dec 10;247(23):7498-501.

Beechem, J.M.; Brand, L.. **Time-resolved fluorescence of proteins.** Annu Rev Biochem.1985;54:43-71.

Bieth, J.G.. **Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics**. Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases, 1995; Vol. 248, pp 59-84.

Birk, Y.. **The bowman-birk inhibitor - trypsin-inhibitor and chymotrypsin-inhibitor from soybeans**. International Journal of Peptide and Protein Research 1985, 25 (2), 113-131.

Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S.. **A pure trypsin inhibitor from soya beans**. Biochemical Journal 1963, 87 (2), 281-&.

Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S.. **Further evidence for a dual independent activity against trypsin and alpha-chymotrypsin of inhibitor aa from soybenas**. Biochimica Et Biophysica Acta 1967, 147 (2), 402-410.

Bode, W.; Huber, R.. **Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases**. European Journal of Biochemistry, 1992, 204 (2), 433-451.

Bode, W.; Huber, R.. **Proteinase-protein inhibitor interaction**. Biomed Biochim Acta. 1991;50(4-6):437-46.

Bowman, D. E.. **Differentiation of soy bean antitryptic factors**. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1946, 63 (3), 547-550.

Branden, C.; Tooze, J..**Introduction to protein structure**. Garland Pub.: New York, 1991.

Brandon, D. L.; Bates, A. H.; Friedman, M..**Monoclonal antibody based enzyme immunoassay of the bowman birk protease inhibitor of soybeans**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1989, 37 (4), 1192-1196.

Brandon, D. L.; Friedman, M.. **Immunoassays of soy proteins**. J Agric Food Chem. 2002 Oct 23;50(22):6635-42.2002; pp 6635-6642.

Brauer, A. B. E.; Leatherbarrow, R. J.. **The conserved P1 ' Ser of Bowman-Birk-type proteinase inhibitors is not essential for the integrity of the reactive site loop**. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003, 308 (2), 300-305.

Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.;

Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L.. **Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.** Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 1998, 54, 905-921.

Cai, S. H.; Dole, V. S.; Bergmeier, W.; Scafidi, J.; Feng, H. P.; Wagner, D. D.; Davis, A. E.. **A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion.** Journal of Immunology 2005, 174 (10), 6462-6466.

Campos, J. E.; Whitaker, J. R.; Yip, T. T.; Hutchens, T. W.; Blanco-Labra, A.. **Unusual structural characteristics and complete amino acid sequence of a protease inhibitor from Phaseolus acutifolius seeds.** Plant Physiology and Biochemistry 2004, 42 (3), 209-214.

Carvalho, A.F.; Santos-Neto, M.S.; Monteiro, H.S.; Freitas, S.M.; Morhy, L.; Nascimento, N.R.; Fonteles, M.C.. **BTCl enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects.** Braz J Biol. 2008 Feb; 68(1):149-54.

Castro, M. J. M.; Anderson, S.. **Alanine point-mutations in the reactive region of bovine pancreatic trypsin inhibitor: Effects on the kinetics and thermodynamics of binding to beta-trypsin and alpha-chymotrypsin.** Biochemistry 1996, 35 (35), 11435-11446.

Catalano, M.; Ragona, L.; Molinari, H.; Tava, A.; Zetta, L.. **Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (Medicago scutellata): Solution structure and analysis of self-association behavior.** Biochemistry 2003, 42 (10), 2836-2846.

Chen, P.; Rose, J.; Love, R.; Wei, C. H.; Wang, B. C.. **Reactive sites of an anticarcinogenic bowman-birk proteinase-inhibitor are similar to other trypsin-inhibitors.** Journal of Biological Chemistry 1992, 267 (3), 1990-1994.

Clayton, A.H.; Sawyer, W.H.. **Tryptophan rotamer distributions in amphipathic peptides at a lipid surface.** Biophys J. 1999 Jun; 76(6):3235-42.

Coombs, G.S.; Rao, M.S.; Olson, A.J.; Dawson, P.E.; Madison, E.L.. **Revisiting catalysis by chymotrypsin family serine proteases using peptide substrates and inhibitors with unnatural main chains.** J Biol Chem. 1999 Aug 20; 274(34):24074-24079.

Cooper, J.B.. **Aspartic proteinases in disease: a structural perspective**. *Curr Drug Targets*. 2002 Apr; 3(2):155-173.

Costa, J.R.; Yaliraki, S.N.. **Role of rigidity on the activity of proteinase inhibitors and their peptide mimics**. *J Phys Chem B*. 2006 Sep 28; 110(38):18981-8.

da Silva, L. P.; Leite, J.; Bloch, C.; de Freitas, S. M.. **Stability of a black eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI)**. *Protein and Peptide Letters* 2001, 8 (1), 33-38.

De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J.L.. **Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the alpha-chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide**. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Dec 30; 88(7):916-924.

De Freitas S.M; Ventura, M.M.. **Vibrational analysis of the secondary structure of the Black-eyed pea (Cowpea) trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI) by Fourier transform infrared spectroscopy**. *An. Acad. Bras. Cien.* 1996, 68 (2) 165-174.

De Freitas, S. M.; deMello, L. V.; daSilva, M. C. M.; Vriend, G.; Neshich, G.; Ventura, M. M.. **Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor alpha-chymotrypsin complex**. *Febs Letters* 1997, 409 (2), 121-127.

de Freitas, S.M.; Ikemoto, H.; Ventura, M.M.. **Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI)**. *J Protein Chem*. 1999 Apr; 18(3):307-313.

de la Sierra, I. L.; Quillien, L.; Flecker, P.; Gueguen, J.; Brunie, S.. **Dimeric crystal structure of a Bowman-Birk protease inhibitor from pea seeds**. *Journal of Molecular Biology* 1999, 285 (3), 1195-1207.

Debreczeni, J. E.; Bunkoczi, G.; Girmann, B.; Sheldrick, G. M.. **In-house phase determination of the lima bean trypsin inhibitor: a low-resolution sulfur-SAD case**. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2003, 59, 393-395.

DeClerck, Y.A.. **Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix**

**by metalloproteinases in cancer.** Eur J Cancer. 2000 Jun;36(10):1258-68.

DeLano, W. L.; Lam, J. W.. **PyMOL: A communications tool for computational models.** Abstr Pap Am Chem Soc 2005 230:U1371–U1372.

Deshimaru, M.; Hanamoto, R.; Kusano, C.; Yoshimi, S.; Terada, S.. **Purification and characterization of proteinase inhibitors from wild soja (Glycine soja) seeds.** Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Sep;66(9):1897-1903.

Desie, G.; Boens, N.; De Schryver, F.C.. **Study of the time-resolved tryptophan fluorescence of crystalline alpha-chymotrypsin.** Biochemistry. 1986 Dec 16;25(25):8301-8.

Dittmann, K.; Mayer, C.; Kehlbach, R.; Rodemann, H.P.. **The radioprotector Bowman-Birk proteinase inhibitor stimulates DNA repair via epidermal growth factor receptor phosphorylation and nuclear transport.** Radiother Oncol. 2008 Mar;86(3):375-382.

Dittmann, K.; Virsik-Köpp, P.; Mayer, C.; Rave-Fränk, M.; Rodemann, H.P.. **Bowman-Birk protease inhibitor activates DNA-dependent protein kinase and reduces formation of radiation-induced dicentric chromosomes.** Int J Radiat Biol. 2003., Oct;79(10):801-8.

Donovan, J.W.; Beardslee, R.A.. **Heat stabilization produced by protein-protein association. A differential scanning calorimetric study of the heat denaturation of the trypsin-soybean trypsin inhibitor and trypsin-ovomuroid complexes.** J Biol Chem. 1975 Mar 25;250(6):1966-1971.

Emsley, P.; Cowtan, K.. **Coot: model-building tools for molecular graphics.** Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 2004, 60, 2126-2132.

Esteves, G. F.; Lima Teles, R. C.; Cavalcante, N. S.; Neves, D.; Ventura, M. M.; Ribeiro, J. A.; Barbosa, G.; de Freitas, S. M.. **Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex.** Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications 2007, 63, 1087-1090.

Fachetti, H. C. S.; Mizuta, K.; Ventura, M. M.. **Thermodynamics of the association of trypsin with the black-eyed pea trypsin and**

**chymotrypsin inhibitor.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1984, 56 (3), 311-317.

Fan, H.; Liu, J.; Ren, W.; Zheng, Z.; Zhang, Y.; Yang, X.; Li, H.; Wang, X.; Zou, G.. **pH induces thermal unfolding of UTI: an implication of reversible and irreversible mechanism based on the analysis of thermal stability, thermodynamic, conformational characterization.** J Fluoresc. 2008 Mar;18(2):305-17.

Fear, G.; Komarnytsky, S.; Raskin, I.. **Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs.** Pharmacology & Therapeutics 2007, 113 (2), 354-368.

Ferreira, S. T.; Stella, L.; Gratton, E.. **Conformational dynamics of bovine cu, zn superoxide-dismutase revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy of the single tyrosine residue.** Biophysical Journal 1994, 66 (4), 1185-1196.

Fodor, K.; Harmat, V.; Hetenyi, C.; Kardos, J.; Antal, J.; Perczel, A.; Patthy, A.; Katona, G.; Graf, L.. **Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition.** Journal of Molecular Biology 2005, 350 (1), 156-169.

Franco, O.L.; dos Santos, R.C.; Batista, J.A.; Mendes, A.C.; de Araújo, M.A.; Monnerat, R.G.; Grossi-de-Sá, M.F.; de Freitas, S.M.. **Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*.** Phytochemistry. 2003 Jun;63(3):343-9.

Frauenfelder, H.; Gratton, E.. **Protein dynamics and hydration.** Methods in Enzymology 1986, 127, 207-216.

Gaier, J. R.; Tulinsky, A.; Liener, I. E.. **Formation, crystallization, and preliminary crystallographic data of the ternary complex of alpha-chymotrypsin, beta-trypsin, and the bowman-birk inhibitor.** Journal of Biological Chemistry 1981, 256 (22), 1417-1419.

GarciaCarreno, F. L.. **Proteinase inhibitors.** Trends in Food Science & Technology 1996, 7 (6), 197-204.

Garcia-Gasca, T.; Salazar-Olivo, L. A.; Mendiola-Olaya, E.; Blanco-Labra, A.. **The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell**

**proliferation and cell adhesion of transformed cells.** Toxicology in Vitro 2002, 16 (3), 229-233.

Gariani, T.; Leatherbarrow, R. J.. **Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases.** Journal of Peptide Research 1997, 49 (6), 467-475.

Gerstenberg, H.; Belitz, H. D.; Weder, J. K. P.. **Isolation and characterization of some proteinase-inhibitors from phaseolus-vulgaris var nanus.** Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung 1980, 171 (1), 28-34.

Gettins, P.G.. **Serpin structure, mechanism, and function.** Chem Rev. 2002 Dec;102(12):4751-804.

Gran, B.; Tabibzadeh, N.; Martin, A.; Ventura, E. S.; Ware, J. H.; Zhang, G. X.; Parr, J. L.; Kenned, A. R.; Rostami, A. M.. **The protease inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis.** Multiple Sclerosis 2006, 12 (6), 688-697.

Gran, B.; Tabibzadeh, N.; Martin, A.; Ventura, E. S.; Ware, J. H.; Zhang, G. X.; Parr, J. L.; Kenned, A. R.; Rostami, A. M.. **The protease inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis.** Multiple Sclerosis 2006, 12 (6), 688-697.

Gratton, E.; Jameson, D. M.; Rosato, N.; Weber, G.. **Multifrequency cross correlation phase fluorometer using synchrotron radiation.** Review of Scientific Instruments 1984, 55 (4), 486-494.

Grinvald, A; Steinberg, I.Z.. **The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins.** Biochim Biophys Acta. 1976 Apr 14;427(2):663-78.

Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowski, F.; Kasprzykowska, R.; Lamkiewicz, L.; Wiczak, W.; Wieczerzak, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, M.; Jaskolski, M.; Grubb, A.. **Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors.** Acta Biochim Pol. 2001;48(1):1-20.

Gueven, N.; Dittmann, K.; Mayer, C.; Rodemann, H.P.. **Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced**

**activation of the EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity.** Int J Radiat Biol. 1998 Feb;73(2):157-162.

Hammond, R. W.; Foard, D. E.; Larkins, B. A.. **Molecular-cloning and analysis of a gene coding for the bowman-birk protease inhibitor in soybean.** Journal of Biological Chemistry 1984, 259 (15), 9883-9890.

Haq, S. K.; Atif, S. M.; Khan, R. H.. **Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection.** Archives of Biochemistry and Biophysics 2004, 431 (1), 145-159.

Hartley, B. S.. **Homologies in serine proteinases.** Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 1970, 257 (813), 77-87.

Hedstrom, L. **Serine protease mechanism and specificity.** Chem Rev. 2002 Dec;102(12):4501-4524.

Hooper, N.M.. **Proteases: a primer.** Essays Biochem. 2002;38:1-8.

Hruska, J. F.; Law, J. H.; Kezdy, F. J.. **Differential Titration Of Trypsin-Like Enzymes.** Biochemical and Biophysical Research Communications 1969, 36 (2), 272-290.

Huang, B.; Ng, T. B.; Fong, W. P.; Wan, C. C.; Yeung, H. W.. **Isolation of a trypsin inhibitor with deletion of N-terminal pentapeptide from the seeds of Momordica cochinchinensis, the Chinese drug mubiezhi.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1999, 31 (6), 707-715.

Huber, R.; Kukla, D.; Ruhlmann, A.; Epp, O.; Formanek, H.. **Basic trypsin inhibitor of bovine pancreas .1. Structure analysis and conformation of polypeptide chain.** Naturwissenschaften 1970, 57 (8), 389-399.

Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Sakata, N.; Nakagaki, C.; Nakamura, S.; Takahashi, K.. **Azuki bean (vigna-angularis) protease inhibitors - isolation and amino-acid sequences.** Journal of Biochemistry 1985, 97 (1), 55-70.

Jensen, B.; Unger, K.K.; Uebe, J.; Gey, M.; Kim, Y.M.; Flecker, P.. **Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performance capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase**

**inhibitors.** J Biochem Biophys Methods. 1996 Dec 30;33(3):171-185.

Joanitti, G.A.; Azevedo, R.B.; Freitas, S.M.. **Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from Vigna unguiculata seeds.** Cancer Lett. 2010 Feb 2. [Epub ahead of print]

Jones, T. A.; Zou, J. Y.; Cowan, S. W.; Kjeldgaard, M.. **Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models.** Acta Crystallographica Section A 1991, 47, 110-119.

Jongsma, M. A.; Bolter, C.. **The adaptation of insects to plant protease inhibitors.** Journal of Insect Physiology 1997, 43 (10), 885-895.

Karban, R.; Baldwin, I. T.. **Induced responses to herbivory.** University of Chicago Press: Chicago, 1997.

Keildlou, V.; Zylber, N.; Imhoff, J. M.; Tong, N. T.; Keil, B.. **Proteolytic Activity Of Pseudotrypsin.** Febs Letters 1971, 16 (4), 291-299.

Kennedy, A. R.. **Antipain, but not cycloheximide, suppresses radiation transformation when present for only one day at 5 days post-irradiation.** Carcinogenesis 1982, 3 (9), 1093-1095.

Kennedy, A. R.. **Cancer prevention by protease inhibitors.** Preventive Medicine 1993, 22 (5), 796-811.

Kennedy, A. R. **Chemopreventive agents: Protease inhibitors.** Pharmacology & Therapeutics 1998, 78 (3), 167-209.

Kennedy, A. R.; Little, J. B.. **Effects of protease inhibitors on radiation transformation invitro.** Cancer Research 1981, 41 (6), 2103-2108.

Kirschner, A.G.; Tanford, C.. **The dissociation of hemoglobin by inorganic salts.** Biochemistry. 1964 3:291-296.

Kleywegt, G. J.; Jones, T. A.. **Databases in protein Crystallography.** Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 1998, 54, 1119-1131.

Koepke, J.; Ermler, U.; Warkentin, E.; Wenzl, G.; Flecker, P.. **Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 angstrom resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity.** Journal of Molecular Biology 2000, 298 (3), 477-491.

Koiwa, H.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M.. **Regulation of protease inhibitors and plant defense.** Trends in Plant Science 1997, 2 (10), 379-384.

Konarev, A. V.; Anisimova, I. N.; Gavrilova, V. A.; Vachrusheva, T. E.; Konechnaya, G. Y.; Lewis, M.; Shewry, P. R.. **Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties.** Phytochemistry 2002, 59 (3), 279-291.

Krahn, J.; Stevens, F. C.. **Lima bean trypsin inhibitor - limited proteolysis by trypsin and chymotrypsin.** Biochemistry 1970, 9 (13), 2646-2652.

Kraut, J.. **Serine proteases - structure and mechanism of catalysis.** Annual Review of Biochemistry 1977, 46, 331-358.

Kumar, P.; Rao, A. G. A.; Hariharaputran, S.; Chandra, N.; Gowda, L. R.. **Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors - Pivotal role of Asp(76) in the dimerization.** Journal of Biological Chemistry 2004, 279 (29), 30425-30432.

Kumar, S.; Tsai, C.J.; Nussinov; R. **Factors enhancing protein thermostability.** Protein Eng. 2000, (13) 179-191.

Kumar, S.; Tsai, C.J.; Nussinov; R. **Thermodynamic differences among homologous thermophilic and mesophilic proteins.** Biochemistry (Mosc). 2001 (40) 14152-14165.

Lakowicz, J. R.. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.

Laskowski, M.; Kato, I.. **Protein inhibitors of proteinases.** Annual Review of Biochemistry 1980, 49, 593-626.

Laskowski, M.; Qasim, M. A.. **What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?** Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 2000, 1477 (1-2), 324-337.

Laskowski, R. A.; Macarthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.. **Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures.** Journal of Applied Crystallography 1993, 26, 283-291.

Lin, G. D.; Bode, W.; Huber, R.; Chi, C. W.; Engh, R. A.. **The 0.25-nm x-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin.** European Journal of Biochemistry 1993, 212 (2), 549-555.

Lin, G. D.; Bode, W.; Huber, R.; Chi, C. W.; Engh, R. A.. **The 0.25-nm x-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin.** European Journal of Biochemistry 1993, 212 (2), 549-555.

Lin, Y.,H.; Li, H.T.; Huang, Y.C.; Hsieh, Y.C.; Guan, H.H.; Liu, M.Y.; Chang, T.; Wang, A.H.; Chen, C.J.. **Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rice Bowman-Birk inhibitor from *Oryza sativa*.** Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2006 Jun 1;62(6):522-524.

Maeder, D. L.; Sunde, M.; Botes, D. P.. **Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops.** International Journal of Peptide and Protein Research 1992, 40 (2), 97-102.

Maiti, R.; Van Domselaar, G.H.; Zhang, H.; Wishart, D.S.. **SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition.** Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32

Martin, C. D.; Ventura, M. M.. **The state of the single tryptophyl of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor by charge-transfer with *n*-methylnicotinamide chloride.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1983, 55 (2), 213-218.

McGurl, B.; Mukherjee, S.; Michael, K.; Ryan, C. A.. **Characterizations of 2 proteinase inhibitor (ATI) CDNAS from alfafa leaves (*Medicago sativa* Var. *Vernema*) – th expression of ATI genes in resposnse tou wounding and soil microorganisms.** Plant Molecular Biology 1995, 27 (5), 995-1001.

McRee, D. E.. **Practical protein crystallography.** Academic Press: San Diego 1993.

Mizuta, K.; Ikemoto, H.; Morhy, L.; Ventura, M. M.. **Reduction and reoxidation of the disulfide bonds of the black-eyed pea**

**trypsin and chymotrypsin inhibitor.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1982, 54 (2), 449-456.

Mizuta, K.; Ventura, M. M.. **State of the phenylalanine residues in the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1983, 55 (1), 129-134.

Morhy, L.; Ventura, M. M.. **The complete amino-acid-sequence of the vigna-unguiculata (I) walp seed trypsin and chymotrypsin inhibitor.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1987, 59 (1-2), 71-81.

Morhy, L.; Ventura, M. M.. **Accessibility of tryptophyl groups in black-eyed pea inhibitor and its complexes with beta-trypsin and-or alpha-chymotrypsin - study by thermal perturbation spectroscopy.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1978, 50 (2), 239-248.

Morris, A.L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M.. **Stereochemical quality of protein structure coordinates.** Proteins 1992 (4): 345-64.

Mosolov, V. V.; Grigor'eva, L. I.; Valueva, T. A.. **Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins (review).** Applied Biochemistry and Microbiology 2001, 37 (6), 545-551.

Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Lebedev, A.; Wilson, K. S.; Dodson, E. J.. **Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT.** Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 1999, 55, 247-255.

Murthy, H. M. K.; Judge, K.; DeLucas, L.; Padmanabhan, R.. **Crystal structure of dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: Implications for flaviviral polyprotein processing and drug design.** Journal of Molecular Biology 2000, 301 (4), 759-767.

Neet, K.E.; Timm, D.E.. **Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation.** Protein Sci. 1994 Dec;3(12):2167-2174.

Nishikawa, T.; Akiyoshi, K.; Sunamoto, J.. **Supramolecular assembly between nanoparticles of hydrophobized polysaccharide and soluble protein complexation between the self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan and alpha-chymotrypsin.** Macromolecules 1994 27 (26), 7654-7659

Norioka, S.; Ikenaka, T.. **Aminoacid sequence of a trypsin chymotrypsin inhibitor B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*).** Journal of Biochemistry 1983, 93 (2), 479-485.

Novello, J. C.. **Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties.** Phytochemistry 2000, 54 (6), 553-558.

Odani, S.; Ikenaka, T.. **Studies on soybean trypsin-inhibitors .8. Disulfide bridges in soybean bowman-birk proteinase inhibitor..** Journal of Biochemistry 1973, 74 (4), 697-715.

Odani, S.; Koide, T.; Ono, T.. **Wheat-germ trypsin inhibitors – isolation and structural characterization of single-headed and double headed inhibitors of the bowman-birk type.** Journal of Biochemistry 1986, 100 (4), 975-983.

Odani, S.; Ono, T.. **Chemical substitutions of the reactive site leucine residue in soybean bowman-birk proteinase-inhibitor with other amino-acids.** Journal of Biochemistry 1980, 88 (5), 1555-1558.

Osman, M.A.; Reid, P.M.; Weber, C.W.. **Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH.** Food Chemistry. 2002 Sept; 78(4) 419-423.

Pace, C.N.; Scholtz, J.M. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein Structure, A Practical Approach** Oxford University Press, New York 1997.

Park, E. Y.; Kim, J. A.; Kim, H. W.; Kim, Y. S.; Song, H. K.. **Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds in ternary complex-with porcine trypsin.** Journal of Molecular Biology 2004, 343 (1), 173-186.

Perrakis, A.; Morris, R.; Lamzin, V. S.. **Automated protein model building combined with iterative structure refinement.** Nature Structural Biology 1999, 6 (5), 458-463.

Pompermayer, P.; Lopes, A. R.; Terra, W. R.; Parra, J. R. P.; Falco, M. C.; Silva-Filho, M. C.. **Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*.** Entomologia Experimentalis Et Applicata 2001, 99 (1), 79-85.

Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E.. **Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases.** Chemical Reviews 2002, 102 (12), 4639-4750.

Prakash, B.; Selvaraj, S.; Murthy, M. R. N.; Sreerama, Y. N.; Rao, D. R.; Gowda, L. R.. **Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors.** Journal of Molecular Evolution 1996, 42 (5), 560-569.

Qi, R. F.; Song, Z. W.; Chi, C. W.. **Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application.** Acta Biochimica Et Biophysica Sinica 2005, 37 (5), 283-292.

Radisky, E. S.; Koshland, D. E.. **A clogged gutter mechanism for protease inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002, 99 (16), 10316-10321.

Rakwal, R.; Agrawal, G. K.; Jwa, N. S.. **Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors.** Gene 2001, 263 (1-2), 189-198.

Rao, K. N.; Suresh, C. G.. **Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure.** Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 2007, 1774, 1264-1273.

Richardson, M.. **Proteinase-inhibitors of plants and microorganisms.** Phytochemistry 1977, 16 (2), 159-169.

Rohrmeier, T.; Lehle, L.. **WIP1 A wound inducible gene from Maize with homology to bowman birk proteinase inhibitors.** Plant Molecular Biology 1993, 22 (5), 783-792.

Ross, J.A.; Jameson, D.M.. **Time-resolved methods in biophysics. 8. Frequency domain fluorometry: applications to intrinsic protein fluorescence.** Photochem Photobiol Sci. 2008 Nov; 7(11):1301-12.

Roychaudhuri, R.; Sarath, G.; Zeece, M.; Markwell, J.. **Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor.** Arch Biochem Biophys. 2003 Apr 1; 412(1):20-6.

Royer, C.A.; Gardner, J.A.; Beechem, J.M.; Brochon, J.C.; Matthews, K.S.. **Resolution of the fluorescence decay of the two tryptophan residues of lac repressor using single tryptophan mutants.** *Biophys J.* 1990 Aug; 58(2):363-78.

Ryan, C. A.. **Proteolytic-enzymes and their inhibitors in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1973, 24, 173-196.

Scarpi, D.; McBride, J. D.; Leatherbarrow, R. J.. **Inhibition of human beta-tryptase by Bowman-Birk inhibitor derived peptides: creation of a new tri-functional inhibitor.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004, 12 (23), 6045-6052.

Schechte, .I; Berger, A.. **On size of active site in proteases .i. Papain.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1967, 27 (2), 157-167.

Schoneich, J.; Braun, R.. **Mutagenesis in germinal tissues of the mouse and the influence of dna-repair.** *Hereditas* 1986, 104 (2), 166-166.

Shewry, P. R.. **Plant-storage proteins.** *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1995, 70 (3), 375-426.

Shewry, P. R.; Lucas, J. A.. **Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens.** In *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 1997; Vol. 26, 135-192.

Silva, L.P.; Azevedo, R.B.; Morais, P.C.; Ventura, M.M.; Freitas, S.M.. **Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches.** *Proteins.* 2005 Nov 15;61(3):642-8.

Silva, L.P.; Leite, J.R.S.A.; Bloch Jr., C.; Freitas, S.M.. **Stability of a black eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCl).** *Prot. Pept. Lett.* 2001 8 (1) :33–38.

Sims, A.H.; Dunn-Coleman, N.S.; Robson, G.D.; Oliver, S.G.. **Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi.** *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Oct 1; 239(1):95-101.

Song, H. K.; Kim, Y. S.; Yang, J. K.; Moon, J.; Lee, J. Y.; Suh, S. W.. **Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 angstrom resolution.** *Journal of Molecular Biology* 1999, 293 (5), 1133-1144.

Steitz, T. A.; Shulman, R. G.. **Crystallographic And Nmr-Studies Of The Serine Proteases**. Annual Review of Biophysics and Bioengineering 1982, 11, 419-444.

Suzuki, A.; Yamane, T.; Ashida, T.; Norioka, S.; Hara, S.; Ikenazka, T..**Crystallographic refinement of Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut at 2,3 angstrom resolution**. Journal of Molecular Biology 1993, 234 (3), 722-734.

Szabo, A. G.; Rayner, D. M..**Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution**. Journal of the American Chemical Society 1980 102 (2), 554-563

Tan, C. G. L.; Stevens, F. C.. **Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component-iv .2. Isolation and sequence determination of chymotryptic peptides and complete amino acid sequence**. European Journal of Biochemistry 1971, 18 (4), 515-530.

Tanaka, A. S.; Sampaio, M. U.; Mentele, R.; Auerswald, E. A.; Sampaio, C. A. M.. **Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from Torresea acreana seeds and comparison with Torresea cearensis trypsin inhibitor (TcTI2)**. Journal of Protein Chemistry 1996, 15 (6), 553-560.

Tang, W.; Diaz, P.; Wilson, K. A.; Tanwilson, A. L.. **Spatial-distribution of protein accumulation in soybean seed**. Phytochemistry 1993, 33 (6), 1289-1295.

Tanwilson, A. L.; Chen, J. C.; Duggan, M. C.; Chapman, C.; Obach, R. S.; Wilson, K. A.. **Soybean bowman-birk trypsin iso inhibitors - classification and report of a glycine-rich trypsin-inhibitor class**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1987, 35 (6), 974-981.

Tiffin, P.; Gaut, B. S.. **Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in Zea and related general**. Molecular Biology and Evolution 2001, 18 (11), 2092-2101.

Tikhonova, T. V.; Gladysheva, I. P.; Kazanskaya, N. F.; Larionova, N. I.. **Hydrolysis of elastin by human-leukocyte elastase and cathepsin-g - inhibition by bowman-birk-type soybean inhibitor**. Biochemistry-Moscow 1994, 59 (11), 1295-1299.

Touil, T.; Ciric, B.; Ventura, E.; Shindler, K. S.; Gran, B.; Rostami, A.. **Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune**

**inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis.** Journal of the Neurological Sciences 2008, 271 (1-2), 191-202.

Tsukada, H.; Blow, D. M.. **Structure of alpha-chymotrypsin refined at 1.68 a resolution.** Journal of Molecular Biology 1985, 184 (4), 703-711.

Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S.; Takahashi, K.. **Structure of the trypsin binding domain of bowman birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin.** Journal of Biochemistry 1986, 100 (6), 1637-1646.

Turk, B..**Targeting proteases: successes, failures and future prospects.** Nature Reviews Drug Discovery 2006, 5 (9), 785-799.

Vagin, A.; Teplyakov, A.. **MOLREP: an automated program for molecular replacement.** Journal of Applied Crystallography 1997, 30, 1022-1025.

Ventura, M. M.; Aragao, J. B.. **Quenching of tryptophyl fluorescence of black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor by iodide and cesium ions - effect of adjacent ionizable groups.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1977, 49 (2), 329-336.

Ventura, M. M.; Filho, J. X.. **A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (vigna sinensis) .i. Purification and partial characterization.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1966, 38 (3-4), 553-567.

Ventura, M. M.; Mizuta, K.; Ikemoto, H.. **Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution - a study by light-scattering.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1981, 53 (1), 195-201.

Ventura, M. M.; Mizuta, K.; Ikemoto, H.. **Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1984, 56 (2), 217-220.

Ventura, M. M.; Oliveira, C. D.; Morhy, L.. **Trypsin and chymotrypsin inhibitor from black eyed pea (Vigna sinensis L) .6. Isolation and properties of complexes with trypsin and**

**chymotrypsin.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1975, 47 (2), 335-346.

Ventura, M.M; Azevedo, M.R.. **Trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (vigna-sinensis I) .3. Phenolic hydroxyl ionization.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1971, 43 (1), 243-&.

Voss, R. H.; Ermler, U.; Essen, L. O.; Wenzl, G.; Kim, Y. M.; Flecker, P.. **Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution - Structural peculiarities in a folded protein conformation.** European Journal of Biochemistry 1996, 242 (1), 122-131.

Walter, J.; Steigemann, W.; Singh, T.P.; Bartunik, H.; Bode, W.; Huber, R.. **On the Disordered Activation Domain in Trypsinogen. Chemical Labelling and Low-Temperature Crystallography.** Acta Crystallogr., Sect. B 1982 38: 1462-1472

Werner, M. H.; Wemmer, D. E.. **3-dimensional structure of soybean trypsin chymotrypsin bowman-birk inhibitor in solution.** Biochemistry 1992, 31 (4), 999-1010.

Yarden, Y.. **The EGFR family and its ligands in human cancer. Signaling mechanisms and therapeutic opportunities.** Eur J Cancer. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.

Yavelow, J.; Finlay, T. H.; Kennedy, A. R.; Troll, W.. **Bowman-birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen.** Cancer Research 1983, 43 (5), 2454-2459.

Yoshizaki, L.; Troncoso, M.F.; Lopes, J.L.; Hellman, U.; Beltramini, L.M.; Wolfenstein-Todel, C.. **Calliandra selloi Macbride trypsin inhibitor: isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses.** Phytochemistry. 2007 Nov;68(21):2625-2634.

Yuan, Z.; Bailey, T.L.; Teasdale, R.D.. **Prediction of protein B-factor profiles.** Proteins. 2005 Mar 1;58(4):905-12.

## 9 ANEXOS

### Fluorescência dinâmica

A fluorescência dinâmica é uma técnica que permite calcular o tempo de vida da fluorescência, isto é, tempo em que os elétrons do fluoróforo permanecem no estado excitado e retornam ao estado fundamental. Os valores encontrados para o tempo de vida de fluorescência indicam se uma amostra contém fluoróforos distintos e em ambientes enterrados ou expostos ao solvente (Nakaema e Sanches, 1998); ou se o ambiente do fluoróforo sofre mudanças conformacionais em decorrência da aproximação de grupos carregados ou por associação de moléculas na formação de complexos ou associação desses grupos com o próprio fluoróforo. Essas análises possibilitam fazer uma previsão da dinâmica das interações entre macromoléculas.

A técnica de fluorescência dinâmica visa fornecer informações sobre a dinâmica das biomoléculas na escala temporal, em nanosegundos, além de informações sobre a acessibilidade das moléculas fluorescentes ao solvente. Proteínas com moléculas fluorescentes intrínsecas têm um tempo de vida associada ao processo de emissão. Este tempo de vida pode ser influenciado pelas interações com o meio ambiente. Por meio do monitoramento do tempo de vida dos corantes fluorescentes, informações importantes podem ser obtidas sobre as interações moleculares e sobre o micro-ambiente. A proximidade de atenuadores, a presença de oxigênio, pH, temperatura, viscosidade e mudanças conformacionais podem alterar a emissão de fluorescência, e por conseqüência, o valor do tempo de vida.

O objetivo das medidas resolvidas no tempo é determinar a forma de decaimento da intensidade do sinal fluorescente e interpretar o decaimento em termos das características físico-químicas da amostra e o seu ambiente molecular (Lakowicz, 2004). No caso de um único tipo de fluoróforo, os

dados resolvidos no tempo podem indicar se este fluoróforo está presente em um ou mais ambientes distintos (já que o tempo de vida é sensível ao ambiente que circunda o fluoróforo); se o fluoróforo sofre reações quando no estado excitado (por exemplo, a transferência de energia) e dar informações sobre o tamanho, forma e mobilidade das moléculas (com medidas de anisotropia) (Nakaema e Sanches, 1998).

A medida do tempo de vida do estado excitado de uma molécula (elétrons de seu fluoróforo) pode ser obtida por duas técnicas: no domínio do tempo ou no domínio da frequência. As informações obtidas com essas técnicas são as mesmas, e a resposta da emissão no domínio da frequência pode ser analisada utilizando dados obtidos pela transformada de Fourier da resposta interpretada da técnica do domínio do tempo, e vice-versa (Nakaema e Sanches, 1998). No domínio do tempo a excitação é feita com pulsos de um laser e o ideal é que eles sejam bem mais curtos do que o tempo que se deseja medir. Além disso, é necessário fazer a deconvolução do sinal de excitação da fluorescência medida. Para se medir tempos menores que nanossegundos são usados lasers de picossegundos ou de femtossegundos (Nakaema e Sanches, 1998).

Com a técnica no domínio da frequência, utilizada neste trabalho, não é necessária a utilização de um laser. Conseguem-se excelentes medidas com uma lâmpada de xenônio (Xe) que é de fácil manuseio e apresenta um amplo espectro de absorção em toda a região do ultravioleta-visível. A frequência da luz no comprimento de onda de excitação é modulada em megahertz e a flutuação da intensidade de emissão é medida em resposta a essa excitação. A modulação de amplitude e o atraso da fase então são utilizadas para determinar o tempo de vida.

As medidas de tempos de vida são geralmente curtas e podem ser determinadas com maior precisão usando um laser ou radiação síncrotron (Nakaema e Sanches, 1998). Com a radiação síncrotron, o sinal é mais intenso, o que possibilita a utilização de amostras bem mais diluídas do

que se utiliza na fonte de radiação de xenônio. Todos os dados são analisados com diferentes modelos de distribuição com um ou mais tempos de vida. O ajuste dos dados é baseado no valor mínimo do  $\chi^2$ .

## **Cristalografia de raios X**

A elucidação da estrutura tridimensional de proteínas pelo método cristalográfico está condicionada à obtenção de cristais de tamanho e qualidade que possibilitem a coleta de dados em difratômetros apropriados. Os principais fatores que podem influenciar e promover a cristalização de proteínas são: pH, força iônica, concentração dos precipitantes (sal, polímero, reagente orgânico volátil e não volátil), aditivos (cátions, ânions, detergentes, agentes caotrópicos, e outros), temperatura e flutuações de temperatura, vibrações, volume da amostra, contaminação por microorganismos, presença de material amorfo, proteólise, pressão, viscosidade da solução estoque de proteína, detergentes, concentração da macromolécula, metais e outros íons específicos, pureza da amostra, e outros. A procura da melhor condição experimental para a obtenção de cristais envolve tempo e depende de todas as variáveis acima citadas.

Dentro desse raciocínio, foi proposto o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991) onde diversas condições diferentes são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica. O método da matriz esparsa possui três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais, são estes: pH e tampões, aditivos e agentes precipitantes, e foram escolhidos os componentes que tinham sido provados como os mais adequados para a cristalização de macromoléculas em ensaios anteriores. Por tentativa e erro a matriz foi simplificada eliminando-se as condições que podem ser parcialmente representadas por resultados de outras

condições (Azevedo, 2004). A empresa Hampton Research, (USA) simplificou o método original, e disponibiliza kits específicos de condições de cristalização, que foram utilizados para a realização deste trabalho. Assim, um número limitado de condições de cristalização foi tentado, usando-se pequenas quantidades de proteína. Para um primeiro ensaio são necessários aproximadamente 5-10 mg de proteína.

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas têm como objetivo trazer a solução da macromolécula biológica a um estado de supersaturação. O método utilizado neste trabalho, e também o mais comum, foi o método de difusão de vapor. Neste método uma gota (sentada, pendurada ou sanduíche) contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota, na fase de vapor, à temperatura controlada, num meio completamente fechado e sem vibrações externas. O equilíbrio prossegue lentamente por meio da difusão até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente a um aumento na concentração da proteína. Durante esse período de equilíbrio da concentração de precipitante nas duas fases, a proteína é trazida a um estado de supersaturação, um estado que é termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver uma organização cristalina.

O acompanhamento do experimento é realizado por meio da observação das gotas em lupa, nas placas de cristalização lacradas, com a menor perturbação possível. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, foi possível determinar que tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis. A partir daí, as condições que apresentaram cristais foram

submetidas a sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais de tamanho maior que 0,2 mm x 0,2 mm.

### **Coleta e processamento de dados de difração por raios-x**

A coleta de dados pode ser realizada com o uso de um difratômetro ou com uso de radiação Síncrotron. Os cristais são banhados em uma solução crioprotetora formulada baseado nas condições de obtenção de cada cristal e só então montados em *loops* de nylon. A coleta é feita com o cristal resfriado instantaneamente num fluxo de nitrogênio gasoso a ~100 K. Isto permite a redução dos efeitos danosos da radiação direta e aumenta o tempo de vida do cristal. Dessa forma há um melhor aproveitamento do material, pois apenas um único cristal pode fornecer dados suficientes para a resolução da estrutura e não é preciso realizar a integração com dados de cristais diferentes. Assim, cada conjunto de imagens geradas de um cristal forma um conjunto de dados a ser analisado. É possível realizar várias coletas e escolher o melhor conjunto de dados. Além disso, os dados coletados a frio apresentam melhor qualidade, pois o resfriamento mantém o nível de organização interna do cristal, necessária para uma boa coleta de dados, preservação da rede cristalina, informação expressa nos resultados pela mosaicidade.

Para a coleta é preciso regular a distância do detector ao cristal de forma a chegar o mais próximo possível da melhor resolução, limitada pela qualidade do cristal. De posse das primeiras imagens é possível realizar a indexação e determinar o grupo espacial, as dimensões e orientação da célula unitária, e estimar a mosaicidade. A partir da medida da distância e dos eixos da rede recíproca do padrão de difração é possível determinar o tamanho e os eixos do cristal no espaço real. Esse passo é necessário para planejar uma estratégia de coleta de dados eficiente, minimizando o tempo e maximizando os

resultados. Na indexação ocorre a identificação dos pontos e a determinação do índice de Miller de cada ponto.

O método de oscilação normalmente utilizado para a coleta, rotaciona o cristal a cada 1° com o objetivo de coletar o máximo de reflexões possíveis, visando propiciar uma maior completeza de dados. A completeza, expressa nos dados após a indexação e integração dos dados, representa a porcentagem do número de reflexões observadas em relação ao número de reflexões possíveis para uma determinada resolução, que está limitada pela qualidade do cristal. Uma completeza de 100% é o resultado desejável, com a maioria das reflexões medidas várias vezes.

No processo de integração é quantificada a intensidade do ponto, retirando-se a contribuição proveniente da difração do solvente. Cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem intensidades gravadas em uma escala diferente umas das outras, por diversos motivos como a variação na radiação incidente, absorção dos raios difratados ou destruição do cristal. Portanto, é necessário colocar todos os pontos em uma mesma escala. Após esse passo pode ser realizada a fusão dos dados: os pontos com o mesmo índice de Miller são somados. Os pontos que foram agrupados como reflexões equivalentes simétricas de diferentes imagens terão suas intensidades somadas. Após esse processo, são obtidos parâmetros para determinar a qualidade do cristal, representado pelos parâmetros da rede cristalina. Após essa etapa os parâmetros de medida de qualidade do modelo ( $R_{\text{merge}}$  e o  $R_{\text{symm}}$ ) são determinados.

Todas as medidas de um mesmo ponto deveriam ter a mesma intensidade, mas na prática isso não acontece. O  $R_{\text{merge}}$  é um parâmetro de concordância entre as várias medidas de intensidade de uma mesma reflexão de imagens ou conjunto de dados diferentes, que indica o quanto elas concordam ou discordam.  $R_{\text{sym}}$  por sua vez, é um parâmetro que relaciona, da mesma forma, as medidas de

intensidade de reflexões simetricamente relacionadas de imagens ou conjunto de dados diferentes (McRee, 1993).

### **Construção e refinamento do modelo da estrutura tridimensional**

O mapa de densidade eletrônica é que permite a construção de um modelo de estrutura tridimensional. A fim de obter esse mapa de densidade de elétrons a amplitude e fase devem ser conhecidas. Durante um experimento de difração a fase não pode ser diretamente medida: isto é conhecido como o problema de fase. A fase inicial pode ser obtida por diversas técnicas, uma delas é a substituição molecular.

Se uma estrutura relacionada é conhecida, ela pode ser usada como um modelo de busca em substituição molecular para determinar a posição e orientação das moléculas dentro da célula unitária. Partindo da observação de que moléculas com seqüências primárias homólogas apresentam enovelamentos similares, o conhecimento destas moléculas estruturalmente conhecidas, permite simular um experimento com um modelo inicial do cristal a ser resolvido, e deste modelo obter as informações necessárias sobre a fase da radiação difratada pelo cristal real. Mas para isso é necessário saber quantas moléculas estão presentes na unidade assimétrica. Esse dado é obtido pelo calculo do volume de Matthews.

Após a integração e indexação, a partir dos dados da célula unitária o coeficiente de Matthews é calculado. Esse dado permite estimar quantas moléculas estão presentes na unidade assimétrica esse número. Com o número de moléculas na unidade assimétrica o próximo passo é resolver a estrutura por substituição molecular, o

que permite a obtenção do primeiro modelo inicial da estrutura tridimensional.

O programa utilizado para o método de substituição molecular permite o cálculo de funções de movimentos de rotação e translação do modelo, cujas coordenadas espaciais de seus átomos referem-se ao seu posicionamento no próprio cristal. De posse das rotações e translações necessárias para posicionar o modelo corretamente na cela unitária, estas transformações são aplicadas e o fator de estrutura ( $F_{\text{calc}}$ ) é calculado. As fases obtidas para cada reflexão são assumidas como as fases correspondentes aos fatores de estrutura observados, e esta informação será utilizada como ponto de partida de um processo de refinamento, para obtenção da estrutura final da molécula difratada.

Após a resolução do problema de fase e construção do primeiro mapa de densidade eletrônica, os resíduos de aminoácidos diferentes do modelo são substituídos pelos resíduos da proteína estudada. Posteriormente, o método de *Simulated annealing* (aquecimento do sistema molecular seguido de resfriamento lento) é realizado apenas no primeiro ciclo de refinamento, visando à acomodação inicial e energética dos átomos a densidade eletrônica. O método de *Simulated annealing* simula a dinâmica molecular de um sistema, elevando-o até altas temperaturas e resfriando o sistema gradualmente até a temperatura ambiente. A idéia principal do método é aquecer a molécula para que os átomos adquiriram altas velocidades e energias cinéticas suficientes para vencerem as barreiras de potencial energético e, quando a temperatura chegar à temperatura ambiente, a estrutura tenha alcançado o seu mínimo energético, com convergência máxima (McRee, 1993).

Cada refinamento realizado utilizando programas como o Refimac do pacote *CCP4* é seguido por uma intervenção manual para

análise da disposição dos átomos dentro do mapa de densidade eletrônica, utilizando um programa de visualização molecular para ajustes da geometria da molécula, otimização dos ângulos das cadeias laterais, otimização das dimensões das ligações covalentes, enquadramento da cadeia principal e cadeias laterais no mapa de densidade eletrônica seguindo o padrão das dimensões das ligações, ajustes do mapa de densidade eletrônica para as densidades negativas e positivas. Após vários ciclos de refinamento, as moléculas de água e heteroátomos que estiverem presentes provenientes da solução de cristalização são inseridos em seus mapas de densidade eletrônica correspondentes, seguidos de vários ciclos de refinamento. Todas as interações das águas com a interface molecular e o solvente são otimizadas considerando-se as dimensões das ligações de hidrogênio.

Refinamento é o processo de encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e a sua estrutura real. Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados ( $F_{\text{calc}}$ ) e os fatores de estrutura observados ( $F_{\text{obs}}$ ). É necessária a realização de vários ciclos de refinamento para que todos os átomos do modelo representem de maneira mais fiel possível a realidade experimental medida, e além disso estejam no melhor posicionamento possível levando em conta geometria da moléculas, valores dos ângulos e dimensão das ligações covalentes. O processo de refinamento visa trazer o valor de ( $F_{\text{calc}}$ ) o mais próximo possível de ( $F_{\text{obs}}$ ), variando as coordenadas atômicas e o fator de temperatura  $B$ , porém, sempre respeitando restrições estereoquímicas e eletrostáticas.

O acompanhamento da qualidade deste processo é feito por meio do cálculo do fator  $R$  durante o processo. O fator  $R$  é uma medida da similaridade entre o modelo cristalográfico utilizado e os dados experimentais da difração de raios-X. Em outras palavras, é

uma medida de quão bem a estrutura refinada prevê os dados observados (Morris *et. al.*, 1992). Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X, uma pequena porcentagem das reflexões é excluída do refinamento e utilizada como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado  $R_{\text{free}}$ , que é isento de minimização artificial. Todas as etapas do refinamento são monitoradas nos arquivos com ênfase para os valores da convergência dos fatores de estrutura para valores compatíveis para estruturas de qualidade estrutural: fator R abaixo de 20% e R free o mais próximo do valor do Fator R ( $R_{\text{factor}}$ ).

### **Análise do modelo obtido**

O arquivo pdb gerado no último ciclo do refinamento, com os valores de  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  convergidos para os valores padronizados para estruturas de alta resolução, é avaliado quanto aos vários parâmetros de qualidade estereoquímica utilizando programas específicos, como o Procheck (Laskowisk ...ver a refe) e o site do PDB ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) com os programas de validação da estrutura tridimensional. As informações estruturais e as condições de cristalização, coleta e refinamento são fornecidas ao PDB. De acordo com a avaliação dos consultores do PDB as coordenadas atômicas podem ser depositadas.