



**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**João Paulo Campos Fernandes**

**Estrutura cristalográfica e atividade dos peptídeos  
derivados do inibidor de proteases de *Vigna unguiculata*  
em complexo com tripsina**

**Brasília**  
**Março - 2019**

**Estrutura cristalográfica e atividade dos peptídeos  
derivados do inibidor de proteases de *Vigna  
unguiculata* em complexo com tripsina**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador  
Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Coorientadora  
Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas

Brasília, Março de 2019

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. JOÃO ALEXANDRE RIBEIRO GONÇALVES BARBOSA (**PRESIDENTE**)

Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SÔNIA MARIA DE FREITAS (**COORIENTADOR**)

Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Betania Ferraz Quirino (**EXAMINADOR EXTERNO**)

Embrapa Agroenergia

Universidade Católica de Brasília - UCB

Prof. Dr. Aisel Valle Garay (**EXAMINADOR**)

Laboratório de Biofísica Molecular

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana de Souza Castro (**EXAMINADOR**)

Laboratório de Toxinologia

Departamento de Ciências Fisiológicas

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (**SUPLENTE**)

Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar ao meu lado, mesmo quando eu estive longe.

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional e pelo apoio dado mesmo longe de casa. Meus sinceros agradecimentos ao meu pai Márcio Antônio Fernandes Abreu que merece o seu nome citado pelo enorme esforço e cumplicidade em realizar meus sonhos.

A minha mãe Eliene Imaculada Campos de Lima Fernandes por todo incentivo, apoio e carinho.

Agradeço a oportunidade me dada em fazer esse estudo e a todos os amigos do laboratório que me acompanharam e estiveram ao meu lado colaborando por este trabalho.

Aos professores que nesse momento são mais que simples fornecedores de conhecimento, mas, são considerados família, amigos, tendo um carinho enorme e marcante na minha formação acadêmica e pessoal. Em especial um agradecimento ao Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, Prof. Dr. Napoleão Fonseca Valadares e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas por todo o aprendizado e pelos exemplos de vida e pelos diversos conselhos ao longo desses anos.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema das proteases e o seu local de clivagem. As setas indicam o local de clivagem em cada um dos exemplos. As exopeptidases clivam nas extremidades (N-terminal ou C-terminal) da cadeia polipeptídica enquanto as endopeptidases clivam nas demais posições da cadeia polipeptídica.

**Figura 2.** Nomenclatura dos subsítios de uma protease e os resíduos complementares de seu substrato (Schechter e Berger, 1967). A protease está representada pela área em rosa. A posição cindível indica a posição que será clivada na cadeia polipeptídica. S1, S1', Sn, são os subsítios correspondentes na protease. P1, P1', Pn são os resíduos do peptídeo. Usualmente não são numerados os resíduos além de P6 e P6'.

**Figura 3.** Tríade catalítica das serino proteases. A tríade está localizada no sítio ativo da enzima, onde ocorre a catálise. A tríade é uma estrutura coordenada que consiste em três aminoácidos: His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> e Ser<sup>195</sup>.

**Figura 4.** Bolsão de especificidade S1 da elastase, tripsina e quimotripsina. Elastase tem especificidade para clivar após resíduos pequenos na posição P1 como valina (Val) e alanina (Ala). Tripsina tem especificidade na posição P1 para resíduos carregados positivamente como lisina (Lys) e arginina (Arg) e o bolsão de especificidade S1 apresenta um resíduo de aspartato (Asp<sup>189</sup>). Quimotripsina tem especificidade na posição P1 para resíduos aromáticos como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) apresentando no bolsão de especificidade S1 um resíduo de serina (Ser<sup>189</sup>). (Adaptado - *Introduction to Protein Structure* (2nd ed.), Garland Publishing, página 123 (1999).

**Figura 5.** Estrutura da tripsina representada em *cartoon*. A estrutura está colorida em *rainbow*, iniciando com N-terminal em azul até o C-terminal em vermelho. A tríade catalítica (His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup>) está representada por *sticks* e esferas semitransparentes. O resíduo Asp<sup>189</sup> posiciona-se no fundo do bolsão de especificidade S1 para um P1 Arg ou Lys.

**Figura 6.** Estrutura da quimotripsina representada em *cartoon*. A cadeia A é uma cadeia curta de 13 resíduos (verde), as cadeias B e C contêm 131 (ciano) e 97 (violeta) resíduos, respectivamente. As cadeias laterais da tríade catalítica (His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup>) e o resíduo do bolsão de especificidade S1 Ser<sup>189</sup> está representado na forma de *sticks* e esferas semitransparentes.

**Figura 7.** Mecanismo catalítico das serino proteases.

**Figura 8.** Exemplos de fontes naturais de inibidores de proteases e suas famílias. **A)** Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* – família BBI). **B)** Soja (*Glycine max* – Família Kunitz/BBI). **C)** Amendoim (*Arachis hypogaea* – família BBI). **D)** Girassol (*Helianthus annuus* - Família BBI). **E)** Cevada (*Hordeum vulgare* – família Kunitz/Cereal/Potato type I) **F)** Melão de São Caetano (*Momordica charantia* – família Squash). **G)** Arroz (*Oryza sativa* – família BBI/Cistatina). **H)** Mostarda-branca (*Brassica hirta* – Família Mustarda) **I)**

Batata (*Solanum tuberosum* – família *Potato type II*). **J**) Jararaca-da-mata (*Bothrops jararaca* – família *Kininogen*). **K**) Mosca (*Sarcophaga peregrina* – família *Kininogen*). **L**) Sapo (*Pelophylax esculentus* – família BBI).

**Figura 9.** **A)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 1PI2). **B)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 1K9B). **C)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 2BBI). **D)** Inibidor BBI derivado de ervilha (*Pisum sativum*) (PDB - 1PBI). **E)** Inibidor BBI derivado de cevada (*Hordeum vulgare*) (PDB - 1C2A). **F)** Inibidor BBI derivado de feijão-azuki (*Vigna angularis*) (PDB - 1TAB). **G)** Inibidor BBI derivado de feijão moyashi (*Vigna radiata*) (PDB - 3MYW). **H)** Inibidor BBI derivado de semente de girassol (*Helianthus annuus*) (PDB - 1SFI).

**Figura 10.** Alinhamento de sequência de diferentes BBI. As cisteínas são conservadas e estão evidenciadas em amarelo.

**Figura 11.** **A)** Complexo binário. Modelo entre o BTCl (verde) em complexo com a tripsina (vermelho). O *loop* que interage com tripsina está destacado em vermelho. **B)** Complexo ternário. Modelo do complexo entre BTCl (verde) e tripsina (vermelho) e quimotripsina (azul). **C)** Modelo do BTCl. O *loop* 1 inibitório (vermelho) está representado entre as fitas 1 e 2. O *loop* inibitório 2 (azul) está localizado entre as fitas 4 e 5. **D)** O *loop* inibitório que interage com quimotripsina está demonstrado em azul, as cadeias laterais dos resíduos Cys<sup>51</sup>, Cys<sup>59</sup> e P1-Phe<sup>53</sup> estão destacadas em *sticks*. O *loop* inibitório que interage com a tripsina está demonstrado em vermelho, as cadeias laterais dos resíduos Cys<sup>24</sup>, Cys<sup>32</sup> e P1-Lys<sup>26</sup> estão destacadas em *sticks*. \*Todas as cisteínas estão destacadas em *sticks* e os átomos de enxofre em amarelo em todas as estruturas.

**Figura 12.** Sequência consenso entre a posição P3 a P6' encontrada nos inibidores BBI. P1 indica o resíduo que determina a especificidade da inibição e Xxx indica qualquer um dos 20 aminoácidos. A ponte de dissulfeto é representada pela linha amarela.

**Figura 13.** Alinhamento das sequências dos peptídeos derivados de BBIs depositadas no PDB. As estruturas resolvidas por cristalografia estão descritas como *XTAL* e as resolvidas por ressonância magnética nuclear com RMN. N\*=número de resíduos na sequência.

**Figura 14.** Estruturas dos peptídeos derivados dos BBIs depositadas no PDB. Cisteínas destacadas em amarelo e *sticks*. **A)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1OX1). **B)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1HD9). **C)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1GM2). **D)** Peptídeo cíclico sintético com 13 resíduos (PDB - 4XOJ). **E)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1SFI). **F)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1JBL). **G)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 4HGC I). **H)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1JBL). **G)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 6BVY).

**Figura 15.** Alinhamento dos peptídeos derivados do BTCl adquiridos. Os peptídeos denominados ptryp9, ptryp8, ptryp7 e ptryp6 foram desenhados para interagir com a tripsina. A linha amarela representa a ligação dissulfeto, fazendo com os peptídeos sejam

cíclicos. Apesar de desenhada apenas para o ptryp6, todos os peptídeos possuem a ligação dissulfeto. N\* = número de aminoácidos na sequência.

**Figura 16.** **A)** Cristal usado na coleta de dados. **B)** Loops usados para coletar os cristais. **C)** Detector Rayonix MarCCD SX165. **D)** Detector Dectris Pilatus 2M.

**Figura 17.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp9.

**Figura 18.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp8.

**Figura 19.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp7.

**Figura 20.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp6.

**Figura 21.** Atividade dos peptídeos ptryp8, ptryp7 e ptryp6.

**Figura 22.** IC<sub>50</sub> do ptryp9.

**Figura 23.** Imagens dos cristais do complexo entre ptryp9 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M, HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

**Figura 24.** Empacotamento cristalino e os canais de solvente. Os canais estão demonstrados pelo espaçamento entre as proteínas. **A)** Empacotamento cristalino no grupo espacial trigonal  $P3_221$ . **B)** Empacotamento cristalino no grupo espacial ortorrômbico  $P2_12_12_1$ .

**Figura 25.** Modelo tridimensional do complexo ptryp9 e tripsina no grupo espacial  $P3_221$ . **A)** Modelo do complexo entre ptryp9\_3 (magenta) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo está representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp9 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.

**Figura 26.** Modelo tridimensional do complexo ptryp9\_5 e tripsina no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . **A)** Modelo do complexo entre ptryp9 (laranja) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo está representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp9\_5 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.

**Figura 27.** *Stereo View (crossed eye)* dos peptídeos ptryp9-D (**A**, magenta) e ptryp9-L (**B**, laranja), os átomos estão representados por esferas e as ligações por barras.

**Figura 28.** Distribuição dos ângulos de torção da ligação S $\gamma$ -S $\gamma$  observados em 1505 pontes dissulfeto em 331 estruturas de proteínas depositadas no PDB. Picos ocorrem em -87 e +97 graus (Retirado e adaptado de Craig DB, *et al.*, 2013).

**Figura 29.** Sobreposição do ptryp9-D (ciano) e ptryp9-L (azul) mostrando os ângulos torcionais entre as cisteínas (S<sub>y</sub>-S<sub>y</sub>). O ângulo torcional para o peptídeo ptryp9-D é de 93,5° e do peptídeo ptryp9-L é de 105,7°. As cadeias laterais dos resíduos Cys<sup>1</sup>, Cys<sup>9</sup> e Lys<sup>3</sup> estão demonstradas em *sticks*.

**Figura 30.** Sobreposição do ptryp9-D (magenta), ptryp9-L (laranja) e BTCI (branco). A ligação de dissulfeto entre as cisteínas (Cys<sup>1</sup> - Cys<sup>9</sup>) esta destacada em amarelo.

**Figura 31.** Sobreposição de peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos derivados de BBIs. **A)** sobreposição dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvidos por cristalografia de raios X. **B)** superposição dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos sintéticos derivados de BBIs naturais resolvidos por RMN.

**Figura 32.** Superfície eletrostática do ptryp9 ligado a tripsina calculada de -5 kT/e a +5 kT/e. O gradiente positivo esta representado em azul e o gradiente negativo em vermelho. **A)** Bolsão S1 da tripsina detacado em vermelho. **B)** Zoom do bolsão S1 com o ptryp9 ligado, a ponte de dissulfeto esta demonstrada em *sticks*.

**Figura 33.** *Stereo view (cross-eye)* do complexo entre ptryp9 e tripsina. **A)** *Stereo view* do ptryp9-L (ciano) em complexo com tripsina (cinza). **B)** *Stereo view* dos contatos intermoleculares do ptryp9-L em complexo com a tripsina. Os contatos estão destacados de amarelo. Lys<sup>3</sup> e Cys<sup>9</sup> estão destacadas. **C)** *Stereo view* dos contatos intermoleculares do ptryp9-D em complexo com a tripsina. Os contatos estão destacados de amarelo. Lys<sup>3</sup> e Cys<sup>9</sup> estão destacadas.

**Figura 34.** Contatos intermoleculares dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D e BTCI. **A)** contatos intermoleculares do ptryp9-D (rosa) destacados em vermelho. **B)** Contatos intermoleculares do ptryp9-L (verde) destacados em preto. **C)** Contatos intermoleculares do BTCI (azul-claro) destacados em preto.

**Figura 35.** Área acessível ao solvente do peptídeo ptryp9 em complexo com a tripsina. A superfície da tripsina em azul escuro e a superfície do ptryp9 em laranja. A tripsina esta demonstrada em *cartoon* e o peptídeo destacado em *sticks*. As cisteínas estão destacadas.

**Figura 36.** Imagens dos cristais do complexo entre ptryp8 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M, HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

**Figura 37.** Modelo tridimensional do complexo ptryp8 e tripsina no grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. **A)** Modelo do complexo entre ptryp8 (azul) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp8 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.

**Figura 38.** Sobreposição do ptryp8 com outros inibidores derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvida por cristalografia de raios X. As cadeias principais da tripsina estão representadas em *ribbons* e os peptídeos em *sticks*.

**Figura 39.** Modelo tridimensional do ptryp8 e a superposição dos peptídeos derivados. **A)** Modelo tridimensional do ptryp8. Destacado em amarelo a distância entre os C $\alpha$ . **B)** Sobreposição do ptryp8 (azul) com o peptídeo do BTCl (branco), ptryp9-L (laranja) e ptryp-D (ciano). **C)** *Stereo View (crossed eye)* da sobreposição do ptryp8 (azul) com o peptídeo do BTCl (branco), ptryp9-L (laranja) e ptryp-D (ciano).

**Figura 40.** Sobreposição dos peptídeos ptryp8 (azul), ptryp9-L (magenta) e ptryp9-D (verde). As interações intermoleculares estão destacadas em amarelo (ptryp8), preto (ptryp9-L) e vermelho (ptryp9-D).

**Figura 41.** Contatos do ptryp8 com a tripsina. A tripsina (azul) está representada em *cartoon* e os resíduos que fazem contato com o ptryp8 (cinza) destacados em laranja. Os contatos estão destacados em amarelo.

**Figura 42.** ASA do peptídeo ptryp8 em complexo com a tripsina. A superfície da tripsina em azul claro e a superfície do ptryp8 em magenta. A tripsina esta demonstrada em *cartoon* e o peptídeo destacado em *sticks* e a ASA do ptryp8 em *mesh*. As cisteínas estão destacadas em amarelo.

**Figura 43.** . Imagens dos cristais do complexo entre ptryp9 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M, HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

**Figura 44.** Modelo tridimensional do complexo ptryp7<sup>tetra</sup> e tripsina no grupo espacial P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2. **A)** Modelo do complexo entre ptryp7<sup>tetra</sup> (laranja) e tripsina (ciano). A tripsina esta representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *stick*. **B)** Modelo do ptryp7<sup>tetra</sup> está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,0$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,0$  do peptídeo em verde.

**Figura 45.** Modelo tridimensional do complexo ptryp7<sup>ortho</sup> e tripsina no grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. **A)** Modelo do complexo entre ptryp7<sup>ortho</sup> (verde) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp7<sup>ortho</sup> está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,0$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. A densidade do ptryp7<sup>ortho</sup> mostrou uma dupla conformação para a cys1 e o C-Terminal na Lys<sup>3</sup>. **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,0$  do peptídeo em verde.

**Figura 46.** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup> com outros peptídeos derivados de BBIs. **A)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup>(roxo) e ptryp7<sup>tetra</sup> (cinza) com outros peptídeos derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvidos por cristalografia de raios X. Tripsina esta representada em *ribbons* e os peptídeos em *sticks*. **B)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> (vermelho) e ptryp7<sup>tetra</sup> (laranja) com o peptídeos ptryp9-L (ciano),ptryp9-D (roxo), BTCl (verde) e sintéticos derivados do BTCl.

**C)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup>, ptryp7<sup>tetra</sup> com outros inibidores derivados de BBIs.

**Figura 47.** Contatos dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup>. A tripsina esta representada em ciano e os peptídeos em sticks. **A)** *stereo view (cross-eye)* dos contatos polares (verde) entre o ptryp7<sup>ortho</sup> (cobre) e a tripsina (ciano). **B)** *stereo view (cross-eye)* dos contatos polares (verde) entre o ptryp7<sup>tetra</sup> (grafite) e a tripsina (ciano).

**Figura 48.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp7. **A)** Área acessível ao solvente (roxa) do ptryp7<sup>ortho</sup> com 3 resíduos destacados em amarelo em complexo com a tripsina representada em *cartoon*. **B)** Área acessível ao solvente (roxa) do ptryp7<sup>tetra</sup> com 5 resíduos destacados em amarelo em complexo com a tripsina representada em *cartoon*.

**Figura 49.** Imagens do cristal do complexo Ptryp6. Os cristais foram obtidos em HEPES sódio 0,1M pH 7,5, sulfato de lítio monohidratado 1,5M.

**Figura 50.** Modelo do complexo entre ptryp6 (verde) e tripsina (ciano). A tripsina esta representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *stick*. Os enxofres das cisteínas estão destacadas em amarelo o *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> esta destacado em verde com um  $\sigma = 1,0$ . **B)** Modelo do ptryp6 (verde) com um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um  $\sigma = 1,0$  (verde). **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 0,5$  do ptryp7 em verde.

**Figura 51.** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas dos peptídeos derivados do BTCl e do BTCl estão representadas apenas as cadeias principais. **A)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp9-L. **B)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp9-D. **C)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do BTCl. **D)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp8. **E)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp6.

**Figura 52.** Sobreposição dos peptídeos derivados do BTCl. **A)** Modelo do ptryp6. A distância entre os C $\alpha$  estão destacadas em amarelo. **B)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com o BTCl (branco). **C)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com os peptídeos ptryp-L (verde) e ptryp9-D (azul). **D)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com o ptryp8 (laranja). **E)** sobreposição do ptryp6 com os peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> (ciano) e ptryp7<sup>tetra</sup> (roxo). **F)** sobreposição de todos os peptídeos derivados do BTCl.

**Figura 53.** *Stereo View (Cross eye)* dos contatos polares do ptryp6. A tripsina esta representada em *cartoon*. As cadeias laterais e o ptryp6 estão representados em *sticks*.

**Figura 54.** ASA do ptryp6 em complexo com a tripsina. A ASA da tripsina (azul) esta complexada com ptryp6 com 6 resíduos representada em *sticks* envolvida por esferas transparentes.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação.

**Tabela 2.** Seletividade nos subsítios P2, P1 e P1'. Restrições de aminoácidos na posição P1 e P2 que bloqueiam a atividade de tripsina na presença de Lys ou Arg na posição P1. \*Quando temos uma prolina na posição P1', a combinação mostrada deve acontecer para que a tripsina tenha atividade.

**Tabela 3.** Condições de cristalização do complexo ptryp9 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

**Tabela 4.** Dados da coleta do complexo Ptryp9 com tripsina.

**Tabela 5.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp9 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 6.** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do Ptryp9\_3 e Ptryp9\_5. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 7.** RMSD das sobreposições dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D e BTCl. N\* representa o número de C $\alpha$  usados no cálculo do RMSD.

**Tabela 8.** Contatos polares de até 3,2 Å do ptryp9-D, ptryp9-L e BTCl. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCl.

**Tabela 9.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp9 – L, ptryp9 – D, peptídeo do BTCl.

**Tabela 10.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp9-L, ptryp9-D e BTCl.

**Tabela 11.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp9-D. Estão demonstradas as cisteína D e L.

**Tabela 12.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp9-L.

**Tabela 13.** Condições de cristalização do complexo ptryp8 com tripsina e quantidade de crioprotetor

**Tabela 14.** Dados da coleta do complexo Ptryp8 com tripsina.

**Tabela 15.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp8 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 16** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do Ptryp8. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 17.** RMSD das sobreposições do peptídeo ptryp8, ptryp9-D, ptryp9-L e BTCl. N\* representa o número de C $\alpha$  usados no cálculo do RMSD.

**Tabela 18.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp8, ptryp9-L e BTCl. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCl.

**Tabela 19.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp9 – L, ptryp9 – D, ptryp8, peptídeo do BTCl.

**Tabela 20.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp8, ptryp9-L e BTCl.

**Tabela 21.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp8.

**Tabela 22.** Condições de cristalização do complexo ptryp7 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

**Tabela 23.** Dados da coleta do complexo Ptryp7 com tripsina.

**Tabela 24.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp7 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 25.** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup>. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 26.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp7<sup>orto</sup>, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp9-L e BTCl. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCl.

**Tabela 27.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D, ptryp8, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup> e peptídeo do BTCl.

**Tabela 28.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup>, ptryp9-L.

**Tabela 29.** Fatores de temperatura do ptryp7<sup>tetra</sup>.

**Tabela 30.** Fatores de temperatura do ptryp7<sup>ortho</sup>.

**Tabela 31.** Condições de cristalização do complexo Ptryp6 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

**Tabela 32.** Dados da coleta do complexo Ptryp6 com tripsina.



**Tabela 33.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp6 com a tripsina. Estatísticas totais e estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses. O limite de resolução é mostrado em Å.

**Tabela 34.** Estatísticas do refinamento do ptryp6. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

**Tabela 36.** ASA dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D, ptryp8, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup>, peptídeo do BTC1 e ptryp6.

**Tabela 35.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp6, ptryp9-L e BTC1. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTC1

**Tabela 37.** ASA e AE dos resíduos do ptryp6.

**Tabela 38.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp6.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\bar{x}$ : Média

$\mu$ : Micro

Å: Ångström

**AE**: Área enterrada

**Aids**: Síndrome da imunodeficiência adquirida

**Ala - A**: Alanina

**Arg - R**: Arginina

**ASA**: Área acessível ao solvente

**Asn - N**: Asparagina

**Asp - D**: Aspartato

**BAPNA**:  $N\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida

**BBI**: *Bowman-Birk inhibitor*

**BPTI**: *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*

**BTCl**: *Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*

**COOT**: *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

**Cys - C**: Cisteína

**EC**: Comissão Enzimática

**FTIR**: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

$\gamma$ : Gama

**Gln - Q**: Glutamina

**Glu - E**: Glutamato

**Gly - G**: Glicina

**His - H**: Histidina

**Ile - I**: Isoleucina

**IUBMB**: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

$K_D$ : Constante de dissociação

**KTI**: *Kunitz trypsin inhibitor*

**Leu - L**: Leucina

**LNLS**: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

**Lys - K**: Lisina

**Met - M**: Metionina

**MR**: Substituição Molecular

**NC-IUBMB:** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

**PDB:** *Protein data bank*

**PDBePISA:** *Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies*

**Phe - F:** Fenilalanina

**PHENIX:** *Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography*

**Pro - P:** Prolina

**RMN:** Ressonância magnética nuclear

**Ser - S:** Serina

**SFTI-1:** *Sunflower Trypsin Inhibitor 1*

**STI:** *Soybean Trypsin Inhibitor*

**Thr - T:** Treonina

**Trp - W:** Triptofano

**Tyr - Y:** Tirosina

**Val - V:** Valina

$\alpha$ : Alfa

$\beta$ : Beta

$\gamma$ : Gama

$^{\circ}$ : Grau

$\phi$ : Phi

$\delta$ : Delta

$\epsilon$ : Epsilon

$\zeta$ : Zeta

$\lambda$ : Lambda

$\sigma$ : Sigma

$\Psi$ : Psi

## RESUMO

Inibidores naturais foram classificados em várias famílias diferentes, entre elas destaca-se a classe de inibidores *Bowman-Birk Inhibitor* (BBI). BBI são moléculas de baixa massa molecular e apresentam alto conteúdo de cisteína. Além de suas funções biológicas, alguns inibidores da família BBI têm sido descritos como agentes supressores de carcinogênese em vários órgãos e tecidos. Um inibidor BBI extraído de *Vigna unguiculata* denominado *Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* (BTCI) foi caracterizado estruturalmente e bioquimicamente. O BTCI apresenta dois *loops* reativos que interagem com tripsina e quimotripsina simultaneamente, por meio dos aminoácidos Lys<sup>26</sup> para inibição de tripsina e Phe<sup>53</sup> para inibição de quimotripsina. Estruturas dos complexos foram depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). Uma análise estrutural dos complexos mostrou a presença de um *loop* inibitório formado pela ligação de dissulfeto entre os resíduos Cys<sup>24</sup> e Cys<sup>32</sup> do BTCI. No presente estudo investigamos estruturalmente e funcionalmente os peptídeos sintéticos derivados dos *loops* inibitórios do BTCI. Foram desenhados variações dos peptídeos sintéticos (ptryp9, ptryp8, ptryp7 e ptryp6) para os estudos propostos. Neste estudo apresentamos a correlação entre ensaios de inibição e as estruturas cristalográficas dos peptídeos sintéticos derivados do BTCI. Vários cristais foram obtidos em diferentes condições dos complexos entre os peptídeos sintéticos e a enzima. Os cristais foram expostos em diferentes comprimentos de onda e seus padrões de difração medidos na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). O ptryp9 foi resolvido em dois grupos espaciais, ptryp8 em um grupo espacial, ptryp7 em dois grupos espaciais e o ptryp6 em um grupo espacial utilizando o método de substituição molecular para a busca inicial das fases. Ao final foram resolvidas 6 estruturas diferentes construídas e refinadas utilizando pacotes computacionais. Os valores de  $R_{free}$  e  $R_{work}$  foram monitorados ciclos após ciclos. Os ensaios de atividade dos peptídeos sintéticos demonstraram diferentes níveis de inibição, sendo o ptryp9 melhor em comparação com os demais. As estruturas cristalográficas dos peptídeos reduzidos mostram mudanças estruturais ocasionados pela redução dos peptídeos propostas apoiando uma hipótese que a redução de sequência altera a atividade desses peptídeos.

## ABSTRACT

Natural inhibitors have been classified into several different families among which the class of inhibitors Bowman Birk Inhibitor (BBI) stands out. BBI are low molecular weight molecules that have high cysteine content. In addition to their biological functions, some inhibitors of the BBI family have been described as suppressive agents for carcinogenesis in various organs and tissues,. A BBI inhibitor extracted from *Vigna unguiculata* called *Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* (BTCl) was characterized structurally and biochemically. BTCl presents two reactive *loops* that interact with trypsin and chymotrypsin simultaneously, by means of the amino acids Lys<sup>26</sup> for inhibition of trypsin and Phe<sup>53</sup> for inhibition of chymotrypsin. Structures of BTCl-enzyme complexes were deposited in the Protein Data Bank (PDB). A structural analysis of the complexes showed the presence of an inhibitory *loop* formed between the disulfide bond between Cys<sup>24</sup> and Cys<sup>32</sup> residues of BTCl. In the present study, we investigated structurally and functionally the synthetic peptides derived from inhibitory *loops* of BTCl. Variations of the synthetic peptides (ptryp9, ptryp8, ptryp7 and ptryp6) were designed for the proposed studies. Several crystals were obtained under different conditions of the complexes between the synthetic peptides and the enzyme. The crystals were exposed at different wavelengths and their diffraction patterns measured at the MX2 line of the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, Brasil). Ptryp9 was solved in two space groups, ptryp8 in one space group, ptryp7 in two space groups and ptryp6 in one space group using the molecular substitution method for the initial search of the phases. In total, 6 different structures were constructed and refined using the computer packages. The  $R_{\text{free}}$  and  $R_{\text{work}}$  values were monitored after cycles. The activity assays of the synthetic peptides demonstrated different inhibition levels, ptryp9 being better compared to the others. The crystallographic structures of the reduced peptides show structural changes caused by the reduction of the proposed peptides supporting a hypothesis that the sequence reduction changes the activity of these peptides.

O que fazemos na vida ecoa por toda a eternidade!

## SÚMARIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Proteases .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Serino proteases.....	22
1.1.2 Tripsina.....	24
1.1.3 Quimotripsina .....	26
1.1.4 Mecanismo de ação .....	28
1.2.1 Inibidores de serino protease .....	30
1.2.2 Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI) .....	37
1.2.3 Peptídeos sintéticos derivados de BBIs.....	41
<b>1.3 Aplicações dos inibidores de protease.....</b>	<b>46</b>
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>49</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Geral:.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Específico:.....</b>	<b>52</b>
<b>4. Materias e Métodos .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Desenhos dos peptídeos.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Ensaio enzimático.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Análises da pureza e sequência dos peptídeos.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4 Cristalização dos complexos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.5 Coleta de dados de difração e processamento dos dados .....</b>	<b>56</b>
<b>4.6 Refinamento e construção dos modelos cristalográficos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.7 Validação da estrutura e análise da interface .....</b>	<b>59</b>
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Ensaio enzimáticos.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Complexo ptryp9 e tripsina .....</b>	<b>67</b>
5.2.1 Cristalização do complexo e coleta de dados .....	67
5.2.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptrp9 e tripsina .....	70
5.2.3 Análise da interface do complexo ptryp9 e a tripsina .....	82
5.2.4 Área acessível ao solvente .....	88
5.2.5 Fatores de temperatura do peptídeo ptryp9.....	90
<b>5.3 Complexo ptryp8 e tripsina.....</b>	<b>93</b>
5.3.1 Cristalização do complexo e coleta de dados .....	93
5.3.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptrp8 e tripsina .....	95

5.3.3	Análise da interface do complexo ptryp8 e a tripsina .....	101
5.3.4	Área acessível ao solvente .....	103
5.3.5	Fatores de temperatura do peptídeo ptryp8.....	105
<b>5.4</b>	<b>Complexo ptryp7 e tripsina.....</b>	<b>107</b>
5.4.1	Cristalização do complexo e coleta de dados .....	107
5.4.2	Estrutura cristalográfica do complexo ptrp7 e tripsina .....	110
5.4.3	Análise da interface do complexo ptryp7 e a tripsina .....	116
5.4.4	Área acessível ao solvente .....	119
5.4.5	Fatores de temperatura do peptídeo ptryp7.....	121
<b>5.5</b>	<b>Complexo ptryp6 e tripsina.....</b>	<b>122</b>
5.5.1	Cristalização do complexo e coleta de dados .....	122
5.5.2	Estrutura cristalográfica do complexo ptrp6 e tripsina .....	124
5.5.3	Análise da interface do complexo ptryp6 e a tripsina .....	130
5.5.4	Área acessível ao solvente .....	131
5.5.5	Fatores de temperatura do peptídeo ptryp6.....	133
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>137</b>



# 1. Introdução

## 1.1 Proteases

As proteases estão presentes em todos os organismos participando em vários processos biológicos. Na literatura as proteases podem ser encontradas como: peptidase, proteinase ou enzima proteolítica significando o mesmo. Nesse texto usaremos apenas o termo proteases para o fácil entendimento. As proteases são imprescindíveis para diversos processos biológicos, como a digestão, a coagulação do sangue, defesa do hospedeiro contra agentes externos, infecção, replicação viral, cicatrização de feridas e doenças progressivas, entre outras funções biológicas (Nelson e Cox, 2011; Neurath H. 1989).

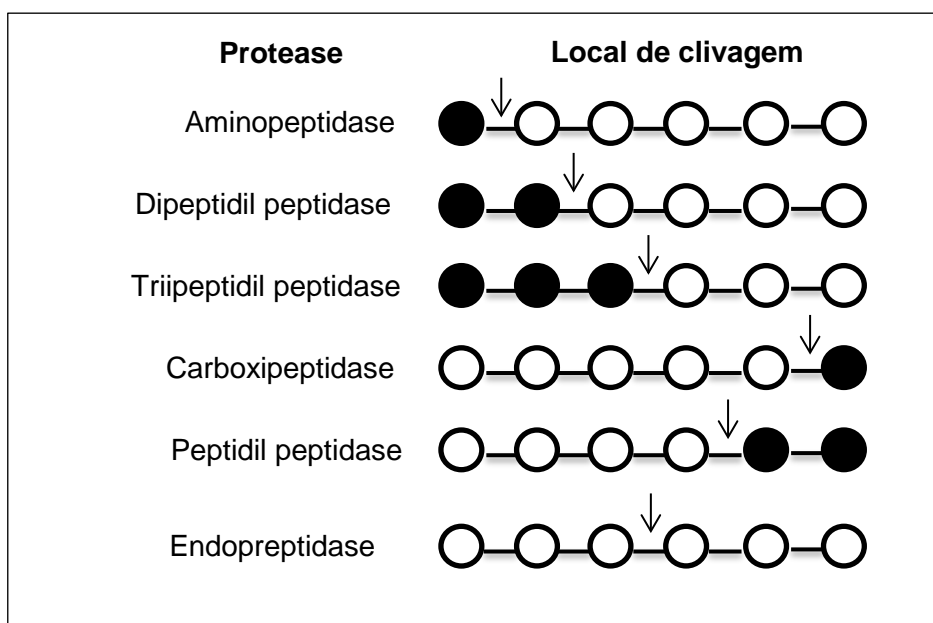
A nomenclatura das enzimas foi inicialmente definida pelo comitê especializado de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) (*Enzyme Nomenclature*, 1992). Um banco de dados *ENZYME* ([expasy.org/enzyme](http://expasy.org/enzyme)) é um repositório de informações relativas à nomenclatura de enzimas, classificando a família de acordo com a atividade biológica exercida e fornecendo um número EC (Comissão Enzimática).

Seis classes de enzimas foram reconhecidas desde que a primeira lista de classificação de enzimas e nomenclatura foi aprovada pela União Internacional de Bioquímica em 1961 (IUBMB, 1961). No entanto, tornou-se evidente que nenhuma das seis classes poderia descrever o grupo de enzimas que catalisam o movimento de íons ou moléculas através das membranas ou sua separação dentro das membranas. Em agosto de 2018 estas enzimas foram classificadas sob uma nova classe. Desta forma, a nomenclatura atual apresenta sete classes baseadas no tipo de reação: oxirredutases (EC 1), transferases (EC 2), hidrolases (EC 3), liases (EC 4), isomerases (EC 5), ligases (EC 6) e translocases (EC 7).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação.

<b>CLASSE DA ENZIMA</b>	<b>TIPO DE REAÇÃO</b>
<b>Oxidoredutases</b>	Reação de óxido-redução ou transferência de elétrons
<b>Transferases</b>	Transferência de grupos funcionais
<b>Hidrolases</b>	Reações de hidrólise
<b>Liases</b>	Quebra de ligações covalentes para formar duplas ligações, ou adição a duplas ligações
<b>Isomerases</b>	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
<b>Ligases</b>	Formação de ligações acoplada à hidrólise de ATP
<b>Translocases</b>	Catalisam a translocação de hidrogênios, cátions inorgânicos, aminoácidos e peptídeos e outros compostos.

As proteases são enzimas que pertencem à subclasse das hidrolases que catalisam a quebra de ligações peptídicas em cadeias polipeptídicas. Proteases podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases que clivam ligações em posições distintas na cadeia polipeptídica (Figura 1). As exopeptidases podem ser subdivididas em aminopeptidase e carboxipeptidase. As aminopeptidase clivam ligações peptídicas da região do N-terminal e as carboxiproteases clivam ligações peptídicas na região do C-terminal (Beynon, R.J. e Bond, J.S. 1989).



**Figura 1.** Esquema das proteases e o seu local de clivagem. As setas indicam o local de clivagem em cada um dos exemplos. As exopeptidases clivam nas extremidades (N-terminal ou C-terminal) da cadeia polipeptídica enquanto as endopeptidases clivam nas demais posições da cadeia polipeptídica.

Uma forma para classificação das proteases é dada pelo mecanismo catalítico, isto é, a propriedade do aminoácido ou cofator que é encontrado no sítio ativo da enzima. Esse resíduo é responsável pelo ataque a ligação peptídica ou pela ativação do co-fator mediando a clivagem (Nelson e Cox, 2011; Neurath H. 1989).

As hidrolases são distribuídas em 13 subgrupos, dentro desses subgrupos estão às proteases que agem em ligações peptídicas divididas em 19 subtipos diferentes. Assim, as proteases mais descritas na literatura são as proteases aspárticas (EC 3.4.23), proteases de cisteína (EC 3.4.22), metaloproteases (EC 3.4.24), serino proteases (EC 3.4.21) e treonina proteases (3.4.25) (Barrett, A. J., *Et. al.*, 2003).

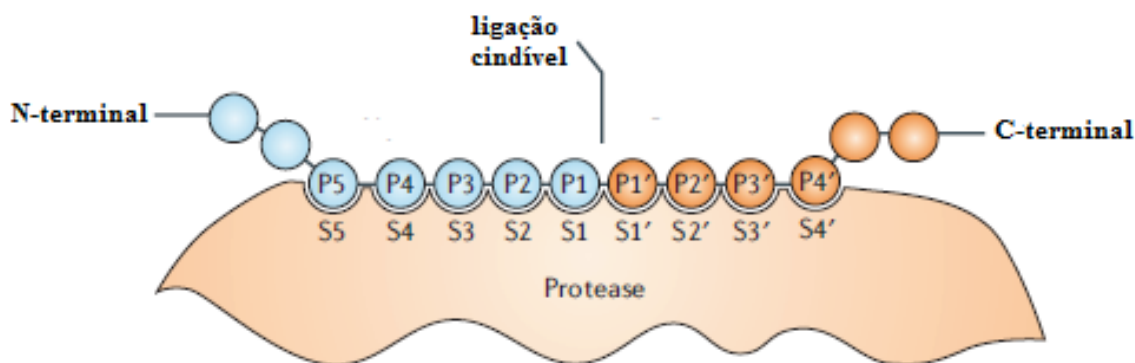
O conjunto completo de proteases presentes em um organismo ou tecidos humanos representa aproximadamente 2 % do genoma humano (X.S. Puente, *et al*, 2003; V. Quesada, *et al*, 2009), divididas em um quantitativo de 3 % proteases aspárticas, 23 % proteases de cisteína, 36 % metaloproteases e 32 % serino proteases (Southan, C., 2001). Proteases aspárticas ou aspartil-proteases, como a protease do HIV, apresentam um resíduo de aspartato envolvido na catálise. As metaloproteases apresentam um íon metálico bivalente, geralmente zinco, mas podendo ser encontrados outros íons como, cobalto, ferro ou manganês, no sítio ativo, podendo ser utilizados como cofatores. As proteases aspárticas e as metaloproteases apresentam um mecanismo catalítico diferente, o agente nucleófilo que ataca a ligação peptídica é uma molécula de água, enquanto que nos demais grupos de protease o agente nucleófilo é um grupo químico de um aminoácido presente no sítio catalítico (Ben M Dunn, 2002). Proteases de cisteína são do tipo em que o nucleófilo é o grupo sulfidrílo (grupo tiol, grupo mercaptano ou grupo sulfidríla) de um resíduo de cisteína. Um exemplo de proteases de cisteína são as caspases, que estão relacionadas com a morte celular programada (Guy S Salvesen, 2002). Nas treoninas proteases e nas serino

proteases o mecanismo catalítico é mediado por um grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de treonina/serina como o agente nucleófilo responsável por atacar a ligação peptídica (Peter N Walsh e Syed S Ahmad, 2002), como nas subunidades catalíticas do proteassoma.

Informações sobre as proteases e seus respectivos inibidores, podem diferir entre organismos, origem, homologia de sequência e estrutura, dentre outros critérios (Rawlings, N.D. e Barrett, 1993). O banco de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) é um recurso de informação para as proteases e seus respectivos inibidores. Neste banco de dados às proteases são classificadas por clã, família e por características individuais. O banco de dados também oferece uma ferramenta de busca por homologia de sequência e estrutural dando uma ênfase na porção responsável pela catálise enzimática. As famílias estão divididas e subdividas em grupos e classificadas de acordo com os critérios de semelhança estrutural, compartilhamento de ancestral comum, entre outros parâmetros, os quais podem ser ajustados de acordo com o interesse.

Uma nomenclatura altamente aceita e aplicada foi introduzida em 1967 por Schechter e Berger (Schechter e Berger, 1967). Essa nomenclatura é baseada na especificidade do local de interação de um substrato com a protease. Nessa nomenclatura é considerado que o sítio catalítico é flanqueado por sublocais de especificidade, onde cada um dos subsítios é capaz de se ligar uma cadeia lateral de um aminoácido. Por convenção, esses subsítios na protease são chamados S (subsítios) e os subtíos do substrato são chamados P (proteína).

Os subsítios localizados na protease que se ligam os resíduos do substrato são descritos como  $S_n$ ...,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ,  $S_1'$ ,  $S_2'$ ,  $S_3'$ , ... $S_n'$ . As cadeias laterais dos aminoácidos que se ligam no subsítio da protease são descritos partindo do N-terminal para o C-terminal como,  $P_n$ ...,  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $P_1'$ ,  $P_2'$ ,  $P_3'$ , ... $P_n'$ . O ponto fundamental para o entendimento da nomenclatura de Schechter e Berger são as posições  $P_1 - P_1'$  da proteína ou substrato que formam a ligação peptídica cindível (hidrolisável ou clivável) que é clivada pela protease. A posição  $P_1$  da proteína ou substrato interage diretamente no sitio  $S_1$  da enzima. (Figura 2) (Schechter e Berger, 1967).



**Figura 2.** Nomenclatura dos subsítios de uma protease e os resíduos complementares de seu substrato (Schechter e Berger, 1967). A protease está representada pela área em rosa. A posição cindível indica a posição que será clivada na cadeia polipeptídica. S1, S1', Sn, são os subsítios correspondentes na protease. P1, P1', Pn são os resíduos do peptídeo. Usualmente não são numerados os resíduos além de P6 e P6'.

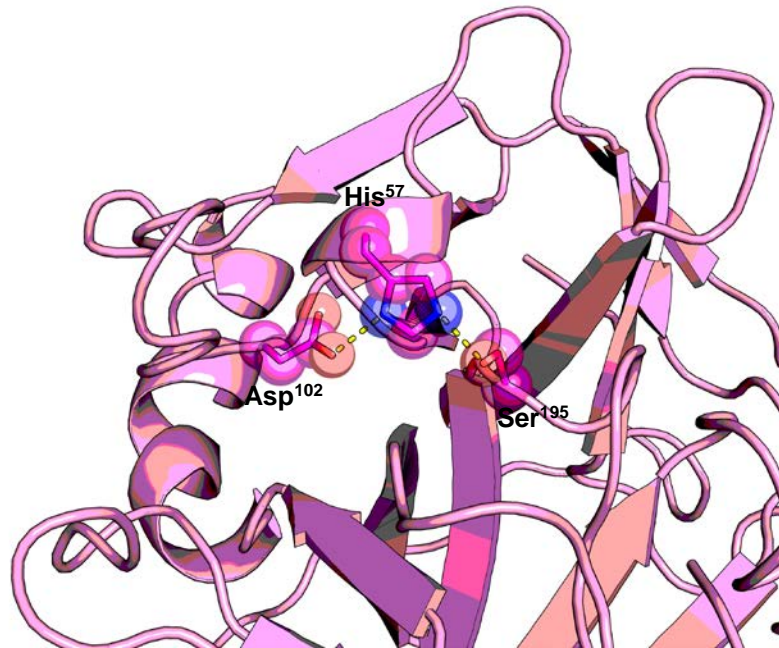
### 1.1.1 Serino proteases

As serino proteases são amplamente disseminadas na natureza, encontradas em todos os reinos da vida (Rawlings ND *et al.*, 2008). Estas enzimas foram denominadas por apresentarem um resíduo de serina que é responsável pelo mecanismo catalítico. Grande parte das serino proteases são biossintetizadas na forma de zimogênios, a forma inativa da enzima. Enzimas digestivas como quimotripsina e tripsina são sintetizadas na forma de zimogênio, uma vez que a enzima na forma ativa pode degradar os tecidos onde são sintetizadas (Khan, A R *et al.* 1999).

As serino proteases estão envolvidas em muitos processos fisiológicos como: digestão, coagulação, dissolução de coágulo sanguíneo, controle do fluxo sanguíneo, lise celular na resposta imunológica, penetração do espermatozoide no óvulo, renovação de proteínas celulares (Stroud, R.M, 1974; Neurath H. 1989 Otlewski, J. *et al.* 1999).

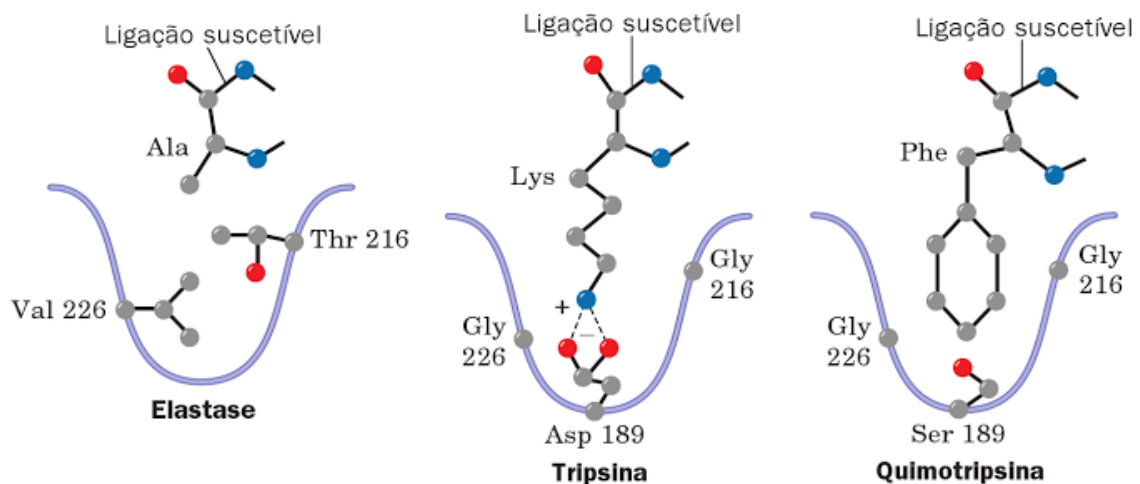
Uma característica comum às serino proteases, como em quimotripsina, tripsina e elastase são a presença dos aminoácidos de Ser<sup>195</sup> e de His<sup>57</sup> que estão descritos como essenciais para sua atividade. Esses resíduos estão

localizados estruturalmente em uma fenda entre barris  $\beta$  da protease, assim como o aminoácido Asp<sup>102</sup> que está imerso em um bolsão inacessível ao solvente (Figura 3). Esses três resíduos interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio e são conhecidos como a tríade catalítica, sendo responsável pela atividade enzimática (Khan, A R *et al.* 1999).



**Figura 3.** Tríade catalítica da tripsina de *bos tauros*. A tríade está localizada no sítio ativo da enzima, onde ocorre a catálise. A tríade é uma estrutura coordenada que consiste em três aminoácidos: His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> e Ser<sup>195</sup>.

Dentre as enzimas que constituem as serino proteases, três delas são bem caracterizadas, estas são quimotripsina, tripsina e elastase. Estas enzimas apresentam propriedades catalíticas semelhantes, porém, com diferentes sítios de especificidades. O subsítio S1 da enzima e o resíduo P1 da proteína são os principais componentes que definem a especificidade da enzima (Figura 4).



**Figura 4.** Bolsão de especificidade S1 da elastase, tripsina e quimotripsina. Elastase tem especificidade para clivar após resíduos pequenos na posição P1 como valina (Val) e alanina (Ala). Tripsina tem especificidade na posição P1 para resíduos carregados positivamente como lisina (Lys) e arginina (Arg) e o bolsão de especificidade S1 apresenta um resíduo de aspartato (Asp<sup>189</sup>). Quimotripsina tem especificidade na posição P1 para resíduos aromáticos como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) apresentando no bolsão de especificidade S1 um resíduo de serina (Ser<sup>189</sup>). (Adaptado - *Introduction to Protein Structure* (2nd ed.), Garland Publishing, página 123 (1999).

### 1.1.2 Tripsina

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma enzima digestiva sintetizada como tripsinogênio na forma de zimogênio no pâncreas e secretada no duodeno. A enteroquinase, uma serino protease localizada na mucosa do duodeno cliva o tripsinogênio especificamente na ligação peptídica entre os resíduos de Lys<sup>15</sup> e Ile<sup>16</sup>, resultando na  $\beta$ -tripsina. Essa nova conformação assumida pela  $\beta$ -tripsina faz com que ela se torne mais ativa que o tripsinogênio (Robinson, N. C *et. al.*, 1973). A tripsina é uma endoprotease que pertence à família S1 das serino proteases, catalizando a hidrólise de ligações peptídicas específicas após resíduos carregados positivamente (Arg e Lys), apresentando uma maior atividade quando a posição P1 é um aminoácido de arginina (Keil, 1992) exceto quando é seguido de prolina (Rodriguez *et. al.*, 2008).

De acordo com Klein existe uma seletividade dos subsítios P2, P1 e P1' para a atividade da tripsina. Ainda de acordo com Klein, a presença de um aminoácido de prolina na posição P1' bloqueia a ação da tripsina com a exceção

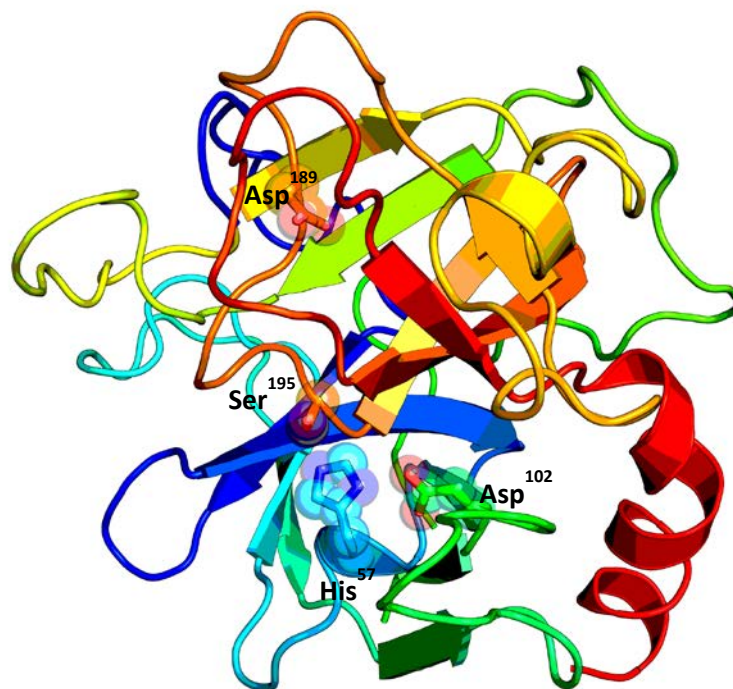
de que na posição P1 tenha uma lisina ou arginina e na posição P2 tenha um aminoácido de arginina ou metionina. Além disso, se um aminoácido de lisina ou arginina é encontrado na posição P1 a seguinte seletividade na posição dos aminoácidos bloqueia a ação da tripsina (Tabela 2).

**Tabela 2.** Seletividade nos subsítios P2, P1 e P1'. Restrições de aminoácidos na posição P1 e P2 que bloqueiam a atividade de tripsina na presença de Lys ou Arg na posição P1. \*Quando temos uma prolina na posição P1', a combinação mostrada deve acontecer para que a tripsina tenha atividade.

P2	P1	P1'
Asp	Lys	Asp
Cys	Lys	Asp
Cys	Lys	His
Cys	Lys	Tyr
Arg	Arg	His
Cys	Arg	Lys
Arg	Arg	Arg
Met	Arg	Pro*
Arg	Lys	Pro*

A estrutura da tripsina bovina foi resolvida em 1974 (Stroud R.M e Dickerson E.R, 1974) por cristalografia de raios X. A tripsina é uma proteína formada por uma cadeia de 223 resíduos, contendo seis ligações dissulfeto. A estrutura da tripsina apresenta um arranjo tridimensional globular com uma única cadeia polipeptídica. A estrutura apresenta folhas  $\beta$  do tipo antiparalelo que juntas se organizam formando dois barris  $\beta$  unidos assimetricamente contendo pequenos segmentos de hélice  $\alpha$  (Figura 5). A resolução da estrutura pôde evidenciar os resíduos mais importantes para a atividade enzimática da tripsina. O bolsão S1 da tripsina é formado pelos resíduos 189 a 195 e 214 a 220. As cadeias principais e várias das cadeias laterais dessa região são expostas para formar várias interações intermoleculares com os resíduos específicos (Arg/Lys) na posição P1 (S. Chakraborty, *et al.* 2000).





**Figura 5.** Estrutura da tripsina de *bos tauros* (PDB – 4I8H). A estrutura está demonstrada com o N-terminal em azul e o C-terminal em vermelho. A tríade catalítica (His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup>) está representada por bastões e esferas semitransparentes. O resíduo Asp<sup>189</sup> posiciona-se no fundo do bolsão de especificidade S1 para um resíduo de Arg ou Lys na posição P1.

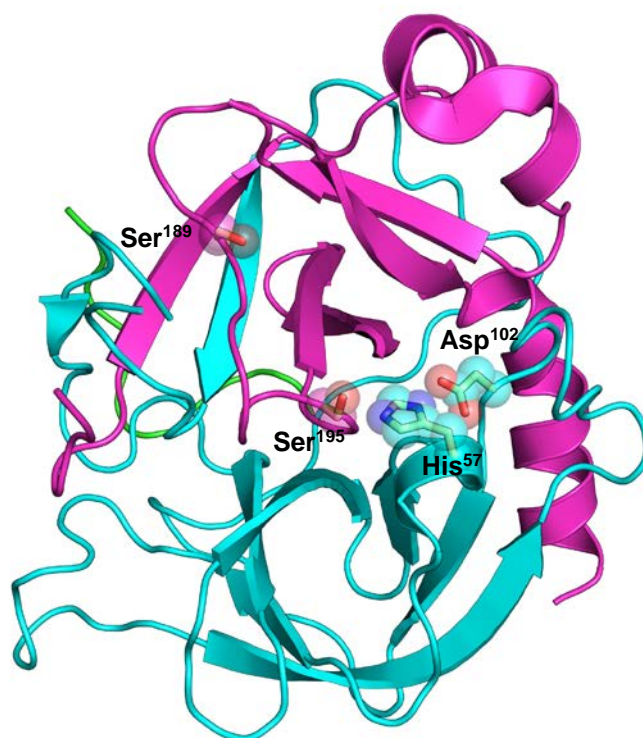
### 1.1.3 Quimotripsina

A primeira serino protease que foi explorada com detalhamento foi a quimotripsina (EC 3.4.21.1), uma enzima digestiva sintetizada no pâncreas, juntamente com as enzimas tripsina e elastase. A quimotripsina é uma enzima digestiva do tipo endoprotease, pertencendo à família S1 das serino proteases. Em 1935 Kunitz e Northrop purificam a quimotripsina (Kunitz e Northrop, 1935) e posteriormente Hartley descreveu a sequência primária (Hartley, 1964).

A estrutura da quimotripsina bovina (Figura 6) foi determinada em 1967 (David M. Blow, 1967) utilizando o método de cristalografia de raios X, sendo a primeira estrutura de uma protease resolvida a um nível atômico e a primeira demonstrando o mecanismo catalítico. Com a resolução da estrutura David Blow foi capaz localizar precisamente os aminoácidos importantes em sua estrutura tridimensional. Inicialmente a quimotripsina é sintetizada na forma de zimogênio

denominada quimotripsinogênio com 245 resíduos. O quimotripsinogênio é ativado pela clivagem específica da ligação peptídica entre a Arg<sup>15</sup> e a Ile<sup>16</sup>, formando a  $\pi$ -quimotripsina. A  $\pi$ -quimotripsina sofre uma autólise removendo dois dipeptídeos, resultando na enzima ativa  $\alpha$ -quimotripsina (H. Tsukada e D.M. Blow, 1985).

A  $\alpha$ -quimotripsina é uma proteína globular composta por dois domínios, onde ambos apresentam folhas  $\beta$  antiparalelas dispostas como barris  $\beta$  na estrutura. A quimiotripsina apresenta especificidade para clivagem de ligações peptídicas após os aminoácidos aromáticos devido ao seu bolsão hidrofóbico (H. Tsukada e D.M. Blow, 1985).



**Figura 6.** Estrutura tridimensional da quimotripsina. A cadeia A é uma cadeia curta de 13 resíduos (verde), as cadeias B e C contêm 131 (ciano) e 97 (violeta) resíduos, respectivamente. As cadeias laterais da tríade catalítica (His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup>) e o resíduo do bolsão de especificidade S1 Ser<sup>189</sup> estão representados na forma de bastões e esferas semitransparentes.

Devido ao seu bolsão hidrofóbico a quimotripsina cliva preferencialmente após os resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina com alta especificidade, podendo também clivar após os resíduos de leucina, metionina e histidina com menor atividade (Keil, 1992). Odani demonstrou que o aminoácido de fenilalanina na posição P1 é o resíduo ideal para inibir quimotripsina, demonstrando a sequência de afinidade decrescente Phe>Trp>Leu>Met>Val>Ala>D-Trp>Gly (Odani, S e Ono, T, 1980). Algumas exceções para os resíduos hidrofóbicos na posição P1 foram descritas (Keil, 1992):

- I. Quando triptofano é encontrado em P1 a clivagem é inexistente quando metionina ou prolina são encontrados na posição P1'.
- II. Quando apresentando um aminoácido de prolina na posição P1 inativa totalmente a clivagem independente do aminoácido na posição P1.
- III. Quando encontrado um aminoácido de metionina na posição P1 a clivagem é bloqueada pela presença do aminoácido tirosina na posição P1'.
- IV. Quando encontrado um aminoácido de histidina na posição P1 a presença de aspartato, metionina ou triptofano em P1' bloqueia a clivagem.

#### **1.1.4 Mecanismo de ação**

Em 1935, o interesse por inibidores de proteases se tornou amplo quando Kunitz e Northrop começaram a investigar e isolaram o inibidor BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) de tripsina extraído do pâncreas bovino (Kunitz, M., e J. H. Northrop, 1935). Posteriormente, em 1945, Kunitz isolou o inibidor STI (*Soybean Trypsin Inhibitor*) de tripsina extraído de sementes de soja (Kunitz, M., 1945).

O BPTI apresenta 58 resíduos em sua sequência primária e sua estrutura foi resolvida por cristalografia de raios X em 1970 por Robert Huber (Huber *et. al.*, 1970). Posteriormente, em 1978 o inibidor BPTI foi resolvido em complexo com tripsina, sendo a primeira estrutura fornecendo informações sobre o mecanismo

de inibição das serino proteases (Huber e Bode, 1978). Devido aos esforços de Huber e colaboradores a resolução do complexo inibidor-enzima forneceu detalhes atômicos a respeito de como o inibidor interage com a enzima. O complexo entre BPTI e tripsina revelou a existência de um intermediário tetraédrico, podendo assim se compreender o mecanismo catalítico (Figura 7).

De acordo com a quimotripsina os passos do processo catalítico podem ser descritos da seguinte forma (Figura 7):

- I. **Ligação de substrato:** A região do substrato/inibidor e o sítio catalítico da enzima interagem de maneira específica através dos seus resíduos P e bolsões S, respectivamente.
- II. **Ataque nucleofílico:** O aminoácido Ser<sup>195</sup> atua como um nucleófilo, auxiliado pela His<sup>57</sup> que sequestra um próton da Ser<sup>195</sup>. Isto é potencializada pelo Asp<sup>102</sup>. O resultado do ataque nucleofílico é uma ligação covalente entre o oxigênio da cadeia lateral da Ser<sup>195</sup> e o carbono da carbonila do resíduo do substrato na posição P1. A carga negativa que se desenvolve no oxigênio da carbonila do substrato é estabilizada por ligações de hidrogênio formadas com a cadeia principal da enzima. Esta região da enzima é chamada de “buraco do oxânionestabilizando a carga negativa no oxigênio.
- III. **Protonação:** O aminoácido de His<sup>57</sup> doa um próton ao nitrogênio do grupo amino do substrato, permitindo a quebra da ligação peptídica do substrato e a liberação do peptídeo contendo novo N-terminal como um peptídeo livre, o primeiro produto da reação.
- IV. **Hidrólise:** O passo final é um ataque pela água à ligação éster entre o peptídeo restante do substrato e o oxigênio da Ser<sup>195</sup>. Isso forma o

segundo produto, um peptídeo com um grupo carboxilo (novo C-terminal), e regenera a hidroxila da Ser<sup>195</sup>. O segundo peptídeo então se dissocia da enzima permitindo outro ciclo catalítico.

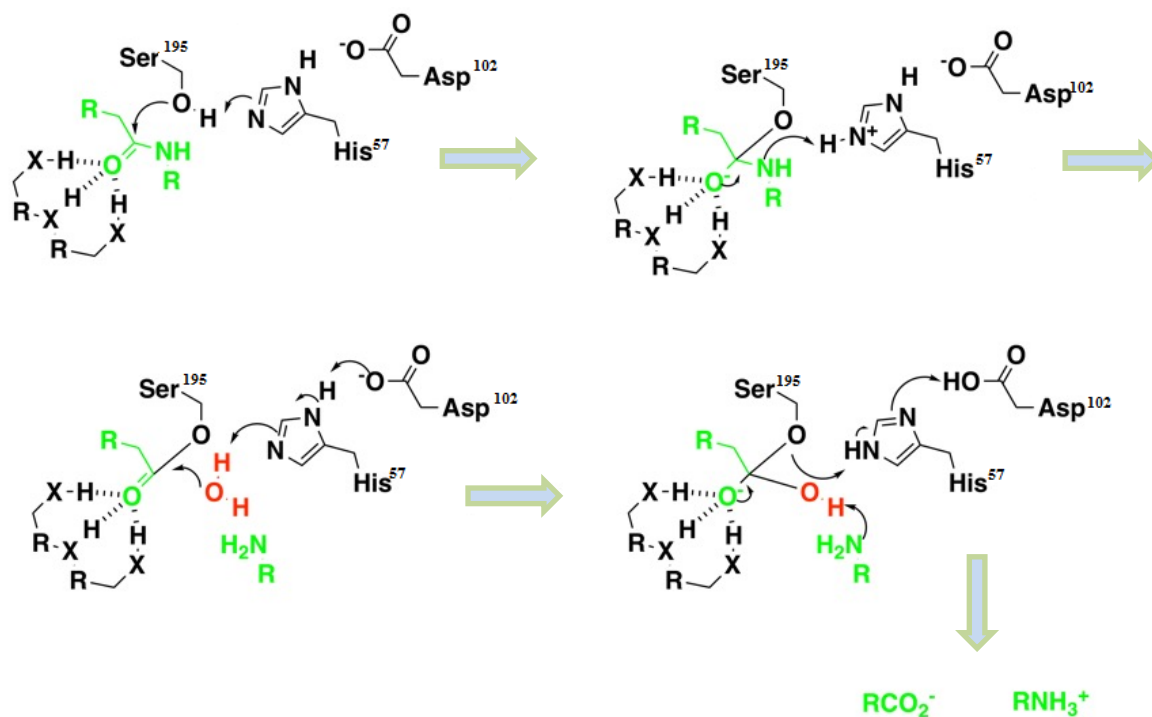


Figura 7. Mecanismo catalítico das serino proteases.

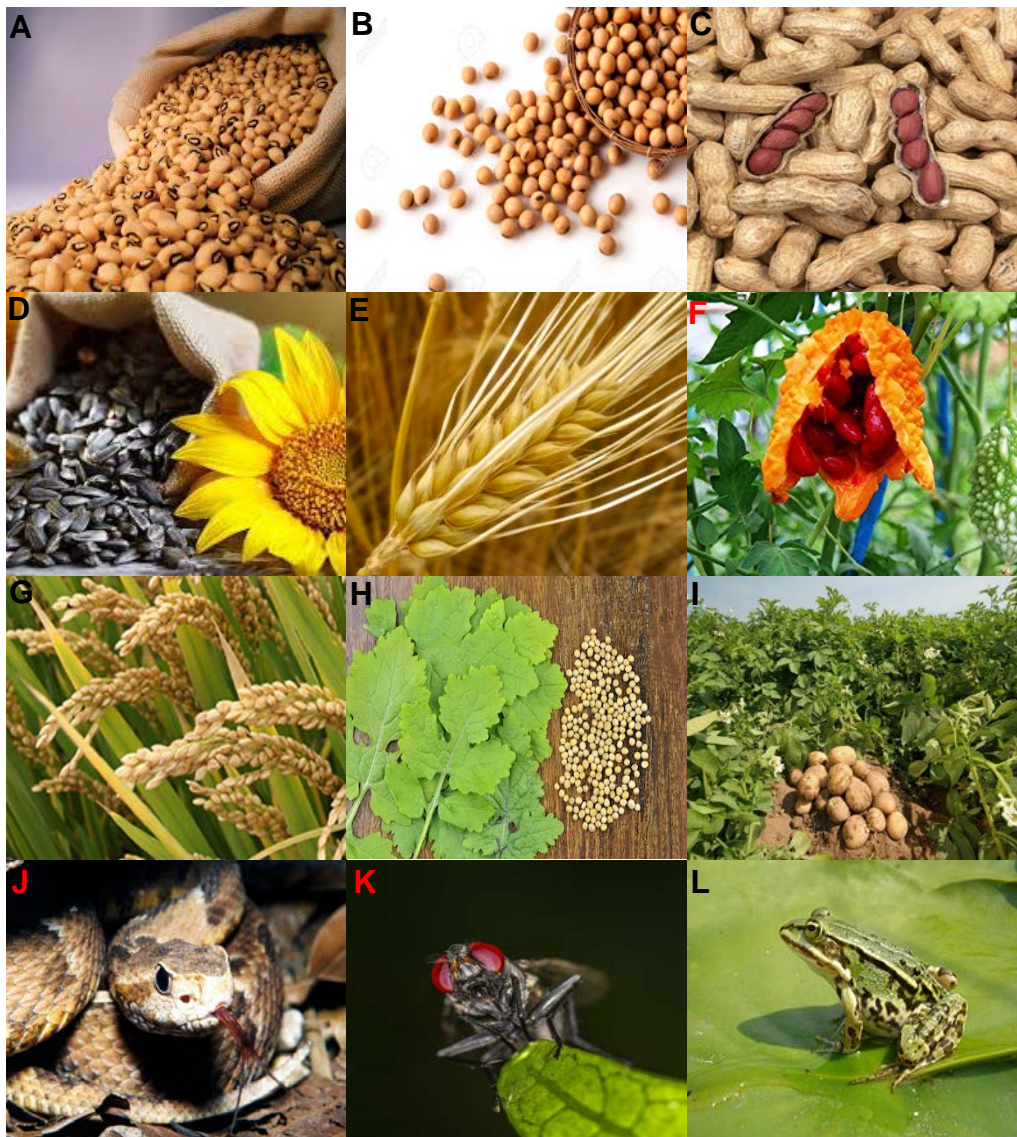
### 1.2.1 Inibidores de serino protease

Os inibidores de serino proteases naturais são capazes de controlar as proteases que participam de muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como liberação de hormônio, digestão, defesa do hospedeiro, coagulação sanguínea, progressão de doenças, hipertensão, distrofia muscular, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e infecções microbianas (Roberts, RM., *et al*, 1995; Almonte, AG, *et al*, 2011; Khan, MS., *et al*, 2011; Clemente, A., *et al*, 2013). Tem sido descrito que os inibidores de proteases desempenham a função no controle dos processos proteolíticos e quando não desempenhados corretamente podem ocasionar uma desordem fisiológica no equilíbrio homeostático, a expansão das células tumorais e de doenças degenerativas (Lopez-Otin, C *et al*, 2008; Farady, CJ *et al*, 2010; Qi, RF *et al*, 2005).

Inibidores de proteases têm sido isolados e caracterizados por um grande número de organismos, incluindo plantas, animais e microorganismos (Valueva e Mosolov, 2004; Christeller, 2005; Haq *et al.*, 2004; Supuran *et al.*, 2002; Mosolov and Valueva, 2005; Mosolov *et al.*, 2001) (Figura 8). Inibidores de proteases de origem natural são essenciais para regular a sua atividade biológica intrínseca (Qi, RF *et al.*, 2005), classificados com base na identidade de sequências, incluindo os inibidores das famílias Serpinas, Kunitz, Kazal, e *Bowman-Birk inhibitors* (BBI) (Otlewski J, *et al.*, 1999; Laskowski e Kato, 1980; Habib e Fazili, 2007).

Inibidores de proteases são encontrados frequentemente em plantas (Richardson, 1991; Shewry, 1998). Os inibidores de proteases provenientes de plantas são geralmente pequenas proteínas que são encontradas principalmente em tecidos de armazenamento como tubérculos e sementes, mas também encontrados nas partes aéreas das plantas (De Leo *et al.*, 2002). Os inibidores de proteases naturais são induzidos em plantas em resposta a ferimentos provocados por insetos ou patógenos (Ryan, 1990). Em plantas, os inibidores de proteases atuam como proteínas anti-metabólicas interferindo no processo digestivo de insetos, fitófagos e microorganismos (Habib e Fazili, 2007). O mecanismo dos inibidores de proteases naturais atua sobre as proteases presentes em tripas de insetos ou secretadas por microorganismos, causando uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (Lawrence e Koundal, 2002; Eckelkamp, 1993; Konarev, A, *et al.*, 2002; Green, T. R e Ryan, A. C, 1972, Richardson, M, 1991; Franco, *et al.*, 2003).





**Figura 8.** Exemplos de fontes naturais de inibidores de proteases e suas famílias. **A)** Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* – família BBI). **B)** Soja (*Glycine max* – família Kunitz/BBI). **C)** Amendoim (*Arachis hypogaea* – família BBI). **D)** Girassol (*Helianthus annuus* – família BBI). **E)** Cevada (*Hordeum vulgare* – família Kunitz/Cereal/Potato type I) **F)** Melão de São Caetano (*Momordica charantia* – família Squash). **G)** Arroz (*Oryza sativa* – família BBI/Cistatina). **H)** Mostarda-branca (*Brassica hirta* – família Mustarda) **I)** Batata (*Solanum tuberosum* – família Potato type II). **J)** Jararaca-da-mata (*Bothrops jararaca* – família Kininogen). **K)** Mosca (*Sarcophaga peregrina* – família Kininogen). **L)** Sapo (*Pelophylax esculentus* – família BBI).

Inibidores de proteases naturais foram reconhecidos como agentes defensivos potentes contra predadores e patógenos por ensaios diretos ou por expressão em plantas transgênicas (Krattiger, 1997). Inibidores de proteases naturais foram testados em vários parasitóides, predadores e patógenos (Lawrence e Koundal, 2002; Pannetier *et al.*, 1997; Koiwa *et al.*, 1998; Urwin *et*

*al.*, 1997; Vain *et al.*, 1998; Williamson e Hussey, 1996). Resultados mostraram que os inibidores de proteases foram capazes de diminuir o desenvolvimento de larvas (*Tribolium confusum*) em soja (Lawrence e Koundal, 2002), o crescimento de nematóides da espécie *Globodera tabacum*, *Globodera pallida* e *Meloidogyne incognita* (Williamson e Hussey, 1996), na regulação gênica induzida por patógenos ou insetos durante germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa*) (Lin *et al.*, 2006) e na germinação de esporos e no crescimento do fungo *Alternaria alternata* em trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum*) (Dunaevskii *et al.*, 1997).

A nome da família BBI foi concedida em referência aos pioneiros no estudo desse tipo de inibidores. Bowman e Birk foram os primeiros a identificar e caracterizar um membro desta família derivado de soja (*Glycine max*) (Bowman 1946; Birk *et al.*, 1963). BBIs são estáveis em altas temperaturas e mantêm sua atividade em uma grande faixa de pH nos sistemas digestivos de humanos e animais (Voss, RH *et al.*, 1996; Philipp, S *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1975; Silva *et al.*, 2001). Os inibidores BBI foram encontrados em leguminosas (*Fabaceae*) (dicotiledôneas), na família das gramíneas (monocotiledôneas) e cereais (*Poaceae*) (Laing e McManus, 2002; Tanaka *et al.*, 1997; Norioka e Ikenaka, 1983; Odani *et al.* 1986).

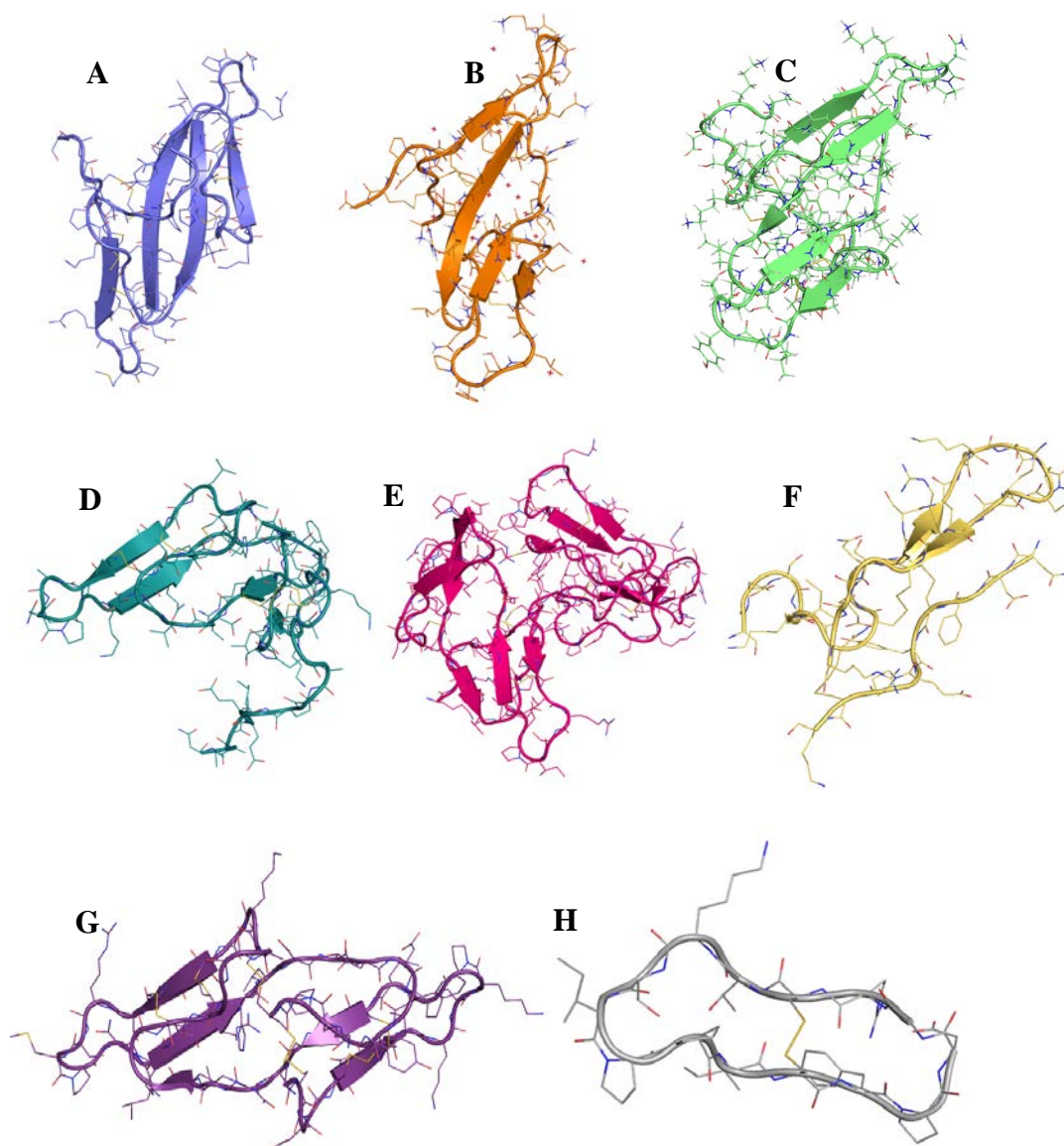
BBIs são inibidores ricos em cisteína em sua sequência e são amplamente distribuídos em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Lin *et al.*, 2006). Em plantas monocotiledôneas são encontrados BBIs de dois tipos. Um tipo consiste em uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de aproximadamente de 8 kDa com apenas um *loop* (alça  $\beta$ ) reativo. Outro tipo apresenta massa molecular de 16 kDa com dois *loops* reativos (Tashiro *et al.*, 1987, 1990; Prakash *et al.*, 1996). Em BBIs encontrados em monocotiledôneas com o tamanho de aproximadamente 8 kDa, o *loop* reativo está localizado apenas no N-terminal com atividade contra tripsina (Prakash *et al.*, 1996).

Os inibidores de plantas dicotiledôneas consistem de uma única cadeia polipeptídica com a massa molecular de 8 kDa, sendo encontrados particularmente em sementes (Laskowski M Jr e Kato I. 1980). Esses inibidores



são conhecidos como de “dupla-cabeça - *double headed*”, com dois domínios homólogos cada um contendo um *loop* reativo. Tem sido sugerido que os BBIs que apresentam em sua estrutura dois *loops* reativos tenham surgido de uma duplicação genética de um inibidor ancestral com apenas um *loop* reativo em sua estrutura (Mello *et al.*, 2003). Os inibidores naturais de BBIs interagem independentemente ou simultaneamente, com duas proteases, que podem ser iguais ou diferentes (Raj *et al.*, 2002; Birk, 1985). O primeiro sítio reativo da maioria dos inibidores de dicotiledôneas inibe a tripsina, enquanto o segundo inibe tripsina, quimotripsina e elastase (Qi *et al.*, 2005). Estruturalmente foi demonstrado que o *loop* reativo inibitório de tripsina está localizado no N-terminal e o *loop* reativo inibitório de quimotripsina está localizado no C-terminal (Odani, S. e Ikenaka, T, 1973; Barbosa *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que os dois locais reativos são separados aproximadamente por 40 Å (Song HK *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2007). Os BBIs estruturalmente compreendem um arranjo binário de dois subdomínios com um arranjo conservado de sete pontes dissulfeto, com um papel principal na estabilização de seus sítios reativos (Chen *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 2007).

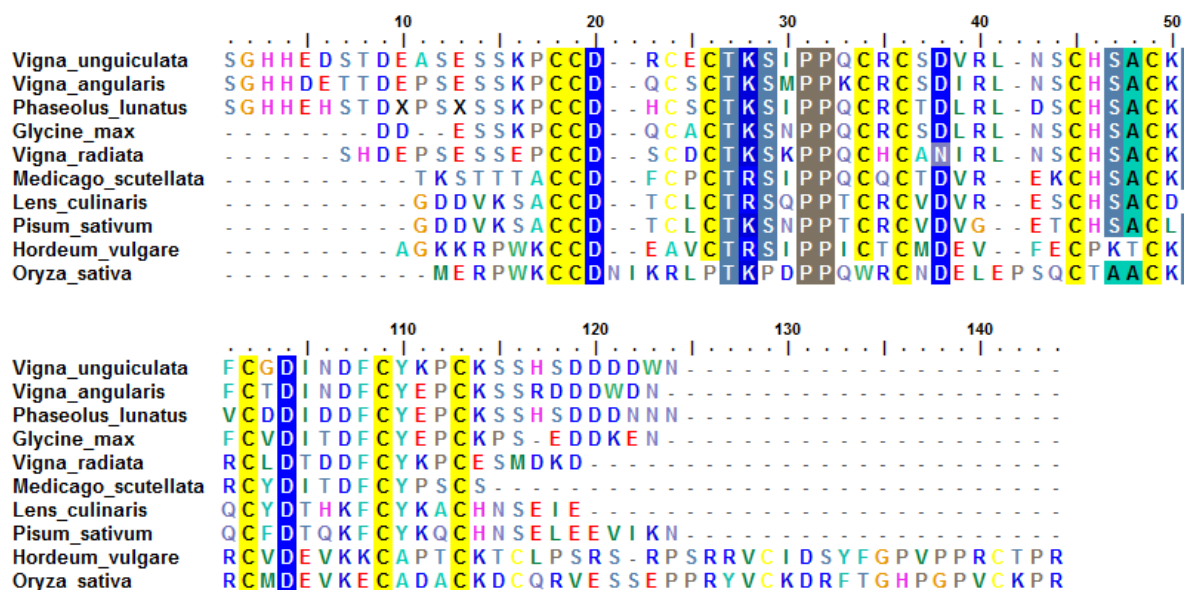
Várias estruturas tridimensionais de BBIs naturais foram resolvidas por cristalografia de raios X (Figura 9). Em BBIs de dupla cabeça, foi demonstrado que a afinidade das proteases pelo inibidor é alterada quando um sítio já está ocupado. Um *loop* reativo com 11 resíduos de BBI foi descrito em amendoim (*Arachis hypogoea*) (Norioka S e Ikenaka T., 1983<sup>A</sup>; Norioka S e Ikenaka T., 1983<sup>B</sup>). O inibidor de amendoim não exibiu nenhuma atividade contra quimotripsina quando ligado com tripsina e vice-versa (Tur *et al.*, 1972). Da mesma forma que a atividade de BBIs de soja diminui 100 vezes quando um sítio já estava ocupado (Tur *et al.*, 1972), é possível que em alguns casos exista um impedimento estérico quando duas proteases independentes tentam se ligar ao inibidor (McBride, J. D., *et al.*, 2002).



**Figura 9.** **A)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 1PI2). **B)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 1K9B). **C)** Inibidor BBI derivado de soja (*Glycine Max*) (PDB - 2BBI). **D)** Inibidor BBI derivado de ervilha (*Pisum sativum*) (PDB - 1PBI). **E)** Inibidor BBI derivado de cevada (*Hordeum vulgare*) (PDB - 1C2A). **F)** Inibidor BBI derivado de feijão-azuqui (*Vigna angularis*) (PDB - 1TAB). **G)** Inibidor BBI derivado de feijão moyashi (*Vigna radiata*) (PDB - 3MYW). **H)** Inibidor BBI derivado de semente de girassol (*Helianthus annuus*) (PDB - 1SFI).

Os BBIs apresentam um alto grau de similaridade de sequência. Os BBIs de dicotiledóneas apresentam em sua sequência 14 cisteínas, enquanto os BBIs de monocotiledóneas com um tamanho semelhante apresentam 10 cisteínas. Essas cisteínas conservadas nos BBIs apresentam uma característica de formar ligações de dissulfeto entre elas que proporcionam estabilidade estrutural e ajudam também a manter a conformação ativa dos *loops* inibitórios (Prakash, B

*et. al.*, 1996; McBride, J. D, *et. al.*, 1998; Odani, S *et. al.*, 1986, Odani, S, *et. al.*, 1973) (Figura 10).



**Figura 10.** Alinhamento de sequência de diferentes BBI. As cisteínas são conservadas e estão evidenciadas em amarelo.

Os BBIs naturais têm sido motivo de investigação por vários estudos, inclusive atuando como um composto anticarcinogênico (Kennedy 1998). O BBI naturais derivado da soja com atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina foi demonstrado como sendo um potencial agente anticarcinogênico em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Kennedy 1998). Inibidores derivados dos BBIs foram demonstrados como sendo adequados na redução na proliferação de células de câncer de mama MCF7 por meio da acumulação de MAP quinase fosfatase-1 (Wen *et al.*, 2005). Além da inibição de proteases já descritas, estes potenciais como compostos anticarcinogênicos tem sido descrito baseado na inibição de outras proteases do tipo tripsina-*like* e quimotripsina-*like* envolvidas nos mecanismos do câncer (McBride, J. D., e Leatherbarrow, R.J., 2001; A Mehdad *et. al.*, 2016).

### 1.2.2 Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI)

O BTCI é uma proteína globular de uma cadeia polipeptídica com 83 resíduos, isolado de sementes de *Vigna unguiculata* (c.v. Seridó) (Ventura e Filho, 1966. Morhy e Ventura, 1987) com uma massa molecular de 9071 Da. Inicialmente Ventura e Aragão mostram que o BTCI não apresentava estruturas secundárias, sendo sua estrutura desprovida de hélice  $\alpha$  (Ventura e Aragão, 1978). Em 1987 estudos desenvolvidos por Morhy e Ventura, purificaram o BTCI e mostraram sua sequência primária (Morhy e Ventura, 1987). O sequenciamento dos aminoácidos mostrou que a sequência do BTCI apresenta uma grande quantidade de cisteínas como é característica dos BBIs. O BTCI apresenta em sua sequência 14 cisteínas, formando 7 ligações dissulfeto ao longo de sua estrutura. Estudos estruturais desenvolvidos por Freitas *et al*, demonstram que BTCI era composto estruturalmente principalmente por folhas  $\beta$  e alças  $\beta$  (Freitas e Ventura, 1996).

O BTCI apresenta vários resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente, o que é considerado fonte de tendências de auto-associação (Barbosa *et. al.*, 2007; P. Kumar, a G.A *et. al.*, 2004; R.H. Voss, U *et. al.*,1996). O BTCI apresenta característica de auto-associação em solução. Utilizando a técnica de microscopia de dispersão da luz e de força atômica foi demonstrado que a auto-oligomerização faz com o BTCI seja encontrado em vários oligômeros, variando dentre monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros (M.M. Ventura *et. al.*, 1981; L.P. Silva, *et. al.*, 2005).

As constantes de dissociação ( $K_D$ ) da interação do BTCI com  $\alpha$ -quimotripsina e tripsina foram previamente estimados em  $1,15 \times 10^{-7}$  M e  $6,25 \times 10^{-9}$  M a 298K respectivamente (S.M. de Freitas *et. al.*, 1999; H.C. Fachetti *et. al.*, 1984). Estudos demonstraram que a interação entre o BTCI e a tripsina é um processo endotérmico e espontâneo com variação entrópica positiva (H.C. Fachetti *et. al.*, 1984; R.J. Baugh *et al*,1972; G.D. Brand *et. al*, 2017). Esse processo é acompanhado por uma mudança de entropia, resultante do deslocamento de moléculas de água localizadas na interface (C. L. Stevens e M. A. Lauffer, 1965; R. Jaenicke e M. A. Lauffer, 1969) Os primeiros estudos

termodinâmicos da interação com BTCI e a  $\alpha$ -quimotripsina demonstraram ser um processo endotérmico e espontâneo no qual a variação entrópica é positiva (S.M. de Freitas, *et al*, 1999), posteriormente Brand e colaboradores utilizando técnicas de ITC (*Isothermal titration calorimetry*) com concentrações de 5  $\mu$ M demonstrou que a interação do BTCI com a  $\alpha$ -quimotripsina é exotérmica (G.D. Brand *et. al*, 2017). Em concentrações mais altas, predominam os fatores endotérmicos, provavelmente derivados da auto-oligomerização do BTCI (S. M. De Freitas *et al*, 1997).

Foram feitas análises *in silico* da interface de interação entre o inibidor BTCI e a tripsina e quimotripsina. Foi demonstrada a capacidade da contribuição virtual para identificação de cadeias laterais de aminoácidos mais importantes para a interação (Honda, D. E, *et al*, 2018).

Ensaio de estruturas secundária realizado por Freitas e Ventura utilizando a técnica de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) mostraram que o BTCI estruturalmente é formado por 32 % de folhas  $\beta$ , 23 % de alças  $\beta$  e 28 % da sua estrutura é desordenado (Freitas e Ventura, 1996).

O BTCI apresenta em sua estrutura sete ligações dissulfeto conferindo uma alta estabilidade estrutural. Essa estabilidade foi demonstrada em diferentes pH, na faixa de pH 3,0 a 10,0. A estabilidade foi testada em temperaturas na faixa de 25 a 95 °C em pH 3,0 e 7,0, demonstrando que após o BTCI ser submetido a essas condições extremas mantém seu nível de atividade em 96 % (Ventura *et. al.*, 1975 e Silva *et. al.*, 2001).

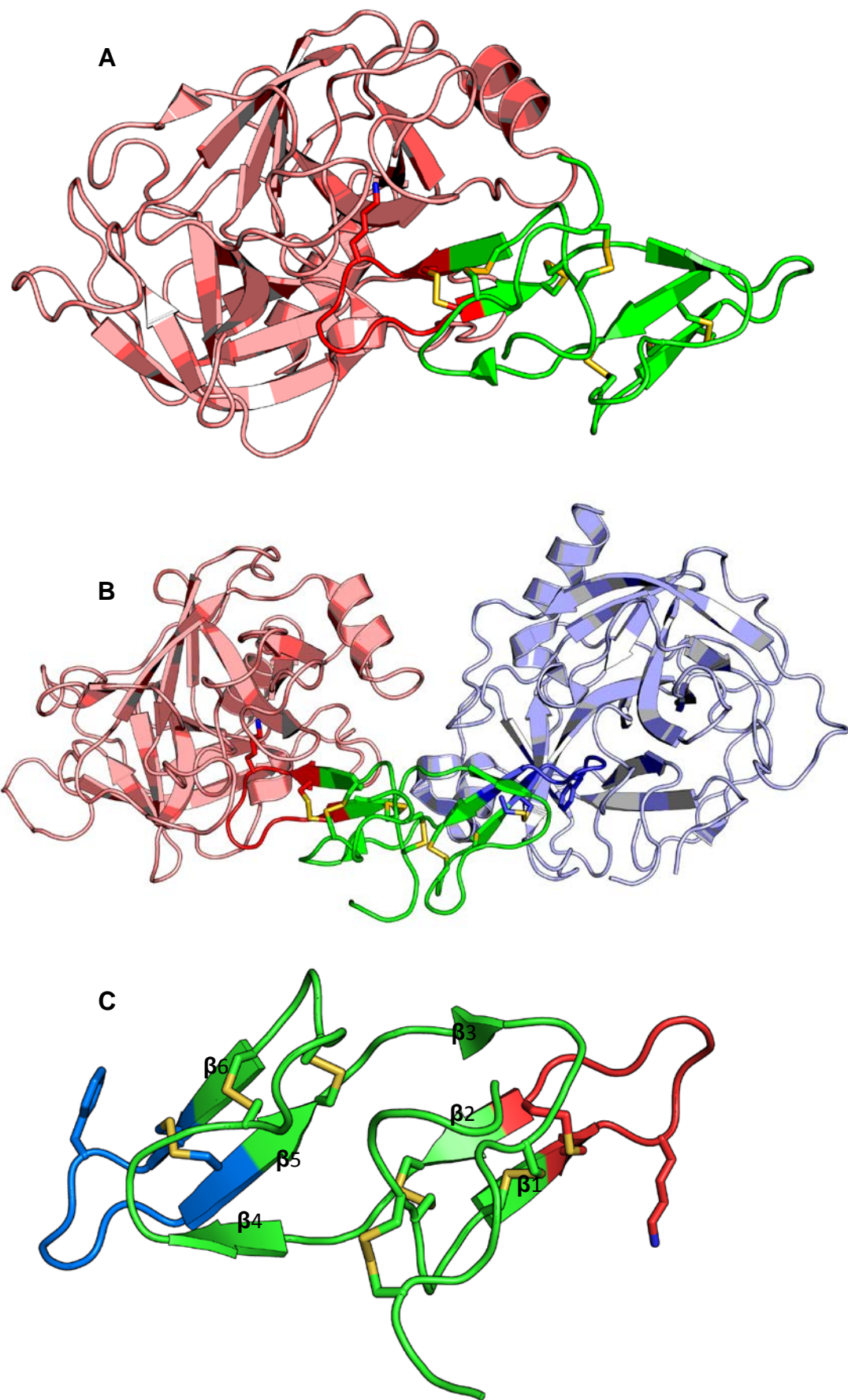
A primeira estrutura do BTCI em complexo com a tripsina (complexo binário) foi resolvida por difração de raios X a 1,55 Å e depositada no PDB com o código 2G81 (Barbosa *et. al.*, 2007). Posteriormente, em 2011 a estrutura do BTCI em complexo com tripsina e quimotripsina (complexo ternário) foi resolvida por difração de raios X com uma resolução de 1,68 Å e depositada no PDB com o código 3RU4 (Figura 11. A-B). A resolução da estrutura apresentou detalhes no nível atômico do BTCI e suas interações com as proteases. A forma geral da molécula de BTCI assemelha-se a um cilindro alongado com dimensões de aproximadamente 42 x 22 x 18 Å<sup>3</sup>. A estrutura do BTCI enovela em dois

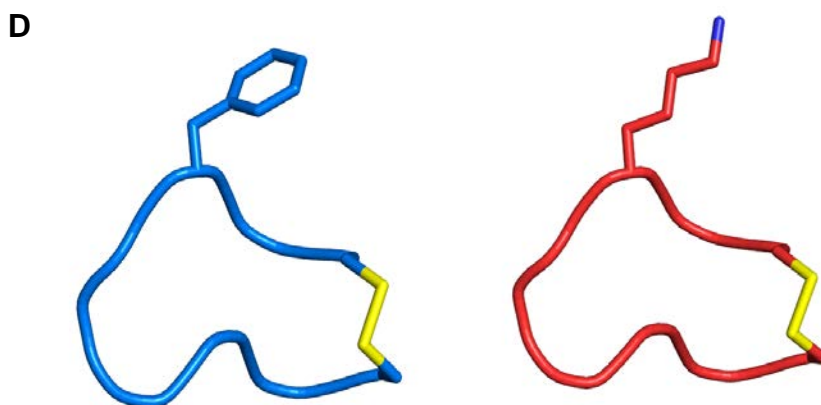
subdomínios compactos semelhantes, cada um com 30 resíduos. Cada subdomínio apresenta 3 fitas- $\beta$  formando uma folha- $\beta$  antiparalela (Figura 11.D). A distância entre os átomos C $\alpha$  dos resíduos de Lys<sup>26</sup> e Phe<sup>53</sup> é de 32,5 Å demonstrando que a estrutura do BTCI é muito semelhante aos outros BBIs. A distância entre os dois loops reativos do BTCI possibilita a inibição de duas proteases simultaneamente e de forma independente (Freitas *et. al.*, 1997; Barbosa *et. al.*, 2007).

O BTCI apresenta dois *loops* reativos delimitados estruturalmente por ligações de dissulfeto que correspondem à região específica para a inibição de proteases. O primeiro o loop reativo (CTKSIPPQC) entre os resíduos de Cys<sup>24</sup> a Cys<sup>32</sup>, localizado no subdomínio 1 entre as fitas 1 e 2, com a presença do resíduo de Lys<sup>26</sup>, específico para a interação com tripsina (Figura 11. D). Interação entre BTCI e tripsina é mediada por muitos contatos polares e ligações de hidrogênio e uma ponte salina entre Lys<sup>26</sup> e Asp<sup>189</sup> (S. M. De Freitas *et al*, 1997). Além de Lys<sup>26</sup> do BTCI, o Asp<sup>189</sup>, Ser<sup>190</sup>, Gly<sup>193</sup>, Ser<sup>195</sup> e Ser<sup>210</sup> da tripsina são os resíduos mais importantes para o processo de inibição (Barbosa *et. al.*, 2007).

O outro *loop* reativo (CTFSIPAQC) entre as Cys<sup>51</sup> a Cys<sup>59</sup>, localizado no subdomínio 2 entre fitas 4 e 5, mostrou a presença do resíduo de Phe<sup>53</sup>, específico para a inibição de quimotripsina (Freitas *et. al.*, 1997; Barbosa *et. al.*, 2007) (Figura 11.D). A análise cristalográfica do BTCI revelou que a ligação do BTCI à quimotripsina é mediada por contatos de natureza hidrofóbica no bolsão S1 (S. M. De Freitas *et al*, 1997). No entanto, existem várias ligações de hidrogênio que são importantes para o processo de inibição envolvendo os resíduos adjacentes ao resíduo Phe<sup>53</sup>, inclusive a cadeia principal da Cys<sup>51</sup> do BTCI com os resíduos Gly<sup>193</sup>, Ser<sup>195</sup> e Gly<sup>216</sup> da quimotripsina (Freitas *et. al.*, 1997).







**Figura 11. A)** Complexo binário. Modelo entre o BTCl (verde) em complexo com a tripsina (vermelho). O *loop* que interage com tripsina está destacado em vermelho. **B)** Complexo ternário. Modelo do complexo entre BTCl (verde) e tripsina (vermelho) e quimotripsina (azul). **C)** Modelo do BTCl. O *loop* 1 inibitório (vermelho) está representado entre as fitas 1 e 2. O *loop* inibitório 2 (azul) está localizado entre as fitas 4 e 5. **D)** O *loop* inibitório que interage com quimotripsina está demonstrado em azul, as cadeias laterais dos resíduos Cys<sup>51</sup>, Cys<sup>59</sup> e P1-Phe<sup>53</sup> estão destacadas em bastões. O *loop* inibitório que interage com a tripsina está demonstrado em vermelho, as cadeias laterais dos resíduos Cys<sup>24</sup>, Cys<sup>32</sup> e P1-Lys<sup>26</sup> estão destacadas em bastões. \*Todas as cisteínas estão destacadas em bastões e os átomos de enxofre em amarelo em todas as estruturas.

### 1.2.3 Peptídeos sintéticos derivados de BBIs

Historicamente os primeiros estudos de caracterização de peptídeos sintéticos derivados de um inibidor BBI natural (soja) foram introduzidos por Nishino e Terada (Nishino, N.*et. al.*, 1975; Nishino, N, *et. al.*, 1977; Terada, S, *et. al.*, 1978). A retenção da atividade inibitória demonstrada em estudos com peptídeos sintéticos derivados de BBIs estimulou vários trabalhos a investigar os requisitos mínimos de tamanho para a manutenção da atividade inibitória (Nishino, N., *et al*, 1975). Nishino e colaboradores sintetizaram pela primeira vez um peptídeo cíclico com atividade baseada nos nove resíduos (resíduos 14 a 22) derivados do *loop* inibitório BBI de soja (Nishino, N., *et al*, 1975). Foi demonstrado que os peptídeos sintéticos descritos por Nishino com o resíduo de Lys na posição P1 inibem a tripsina com valores de micromolar (Nishino, N., *et al*, 1977). Terada e colaboradores demonstraram resultados semelhantes aos apresentados



por Nishino utilizando peptídeos sintéticos derivados de BBIs (Terada, S., *et al*, 1978). As sequências dos nonapeptídeos sintéticos analisados por Terada foram CTKSNPPQC e CALSTPAQC (Terada, *et al.*, 1978). As sequências dos nonapeptídeos sintéticos analisados foram modificados na posição P1 (sublinhado) demonstrando os resíduos que conferem especificidade para tripsina e quimotripsina (Terada *et al.*, 1978).

No início dos anos 90 foi demonstrado que os peptídeos sintéticos derivados dos *loops* inibitórios dos BBIs mantinham uma atividade inibitória significativa e suas características eram mantidas em comparação as proteínas originais (Li, Y. L. *et al*, 1994; Zhu, G. *et al*, 2001; Brauer, A. *et. al.*, 2001). A conservação da atividade dos peptídeos sintéticos sugeriu a hipótese de que os *loops* reativos dos BBIs representam um motivo estrutural independente (Brauer, A. *et. al.*, 2001). Posteriormente vários inibidores peptídicos, isolados de bibliotecas foram descritos, incluindo inibidores de  $\alpha$ -quimotripsina (Krook, M., *et al.*, 1997), fator VIIa (Dennis, M. S. *et al.*, 2000), antígeno específico da próstata (Wu, P., *et al.*, 2000), e calicreína-2 humana (Heinis, C., *et al.*, 2009; Hekim, C.*et al.*,2006), dentre outros.

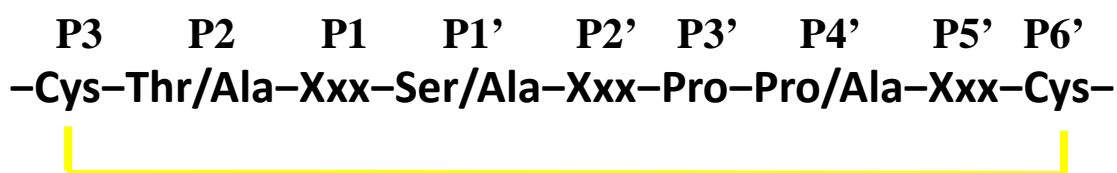
Têm sido reportados peptídeos sintéticos derivados dos *loops* reativos de sementes de girassol da espécie *Helianthus annuus* (Luckett, S. 1999; Korsinczky, M. L. 2001), de sementes de melão da espécie *Momordica cochinchinensis* (Heitz, A., *et al*, 2001; Hernandez, JF, *et al*, 2000) e de diversos peptídeos derivados da pele de sapos (Li *et al.*, 2007; S. Chakraborty, *et al.*, 2000; L. Zhang. *et al*, 2018) . Desde então, muitos estudos descreveram peptídeos mono, bi e tricíclicos projetados para imitar a atividade inibitória dos BBI (McBride, J. D, *et al*, 2002).

O menor inibidor BBI natural descrito vem de sementes de girassol, apresenta 14 aminoácidos (GRCTKSIPPICFPD), massa de 1513 Da e uma ligação de dissulfeto (Cys<sup>3</sup> - Cys<sup>11</sup>) (Luckett, S. *et. al.*, 1999). O inibidor SFTI-1 (*sunflower trypsin inhibitor 1*) apresenta atividade inibitória especificamente contra tripsina (Korsinczky, M *et. al.*, 2001). Devido a sua compacta estrutura, SFTI-1 apresenta um modelo para estudos de inibidores derivados de BBIs. Peptídeos derivados do SFTI-1 com 9 aminoácidos (CTKSIPPIC) com uma

ligação de dissulfeto (Cys<sup>1</sup> - Cys<sup>9</sup>) foram sintetizados (M. L. Korsinczky, *et al.*, 2004).

Os estudos de peptídeos sintéticos derivados de BBIs demonstraram que a atividade dos peptídeos é dependente da ciclização da estrutura, onde, os que não exibem essa característica apresentam pouca ou nenhuma atividade inibitória (Domingo, G. J, *et al*, 1995; Terada, S., *et al*, 1978, Dittmann, K. H., *et al*, 2001; McBride, J. D, *et al*, 2002). Isso foi confirmado pelos estudos dos análogos derivados do peptídeo de SFTI-1 (Zablotna, E. *et al*, 2002; Jaulent, A. M, *et al*, 2001). Foi demonstrado que os análogos dos peptídeos de SFTI-1 que apresentavam ciclização por ligação de dissulfeto ou por ligação do C-terminal com o N-Terminal apresentavam alguma atividade inibitória, análogos que estavam lineares não apresentavam atividade (Zablotna, E. *et al*, 2002; Jaulent, A. M, *et al*, 2001). Outro estudo desenvolvido por Maeder demonstrou que um peptídeo cíclico derivado de uma leguminosa da espécie *Macrotyloma axillare* com 11 resíduos (SCTKSIPPQCY) apresentou maior atividade inibitória do que o inibidor com 9 resíduos (CTKSIPPQC) (Maeder, D. L. *et al*, 1992). De acordo com Gariani uma hipótese é que resíduos adicionais depois das pontes de dissulfeto melhoram as propriedades de inibição conferindo uma maior estabilidade estrutural (Gariani, T. *et. al.*, 1997).

Em geral inibidores BBIs (incluindo BTC1) apresentam uma sequência consenso com um núcleo de 9 aminoácidos entre a posição P3 a P6' (Prakash *et al.*, 1996) (Figura 12).



**Figura 12.** Sequência consenso entre a posição P3 a P6' encontrada nos inibidores BBI. P1 indica o resíduo que determina a especificidade da inibição e Xxx indica qualquer um dos 20 aminoácidos. A ponte de dissulfeto é representada pela linha amarela.

Além dos resíduos de cisteína são descritos vários resíduos altamente conservados para a conservação dos peptídeos sintéticos derivados dos BBIs

(Song HK *et al.*, 1999). Tsunogae descreveu que a presença da prolina na posição P3' apresentando uma configuração *cis* (Tsunogae Y, *et al.*,1986) e uma cisteína na posição P3 são essenciais para a formação da ligação de dissulfeto (Tsunogae Y, *et al.*,1986). Estudos descritos por Gariani demonstraram que peptídeos com mais de 9 resíduos e mais de uma ligação de dissulfeto em sua estrutura apresentavam melhora na sua atividade e uma maior estabilidade estrutural (Gariani, T. e Leatherbarrow, R., *et al*, 1997).

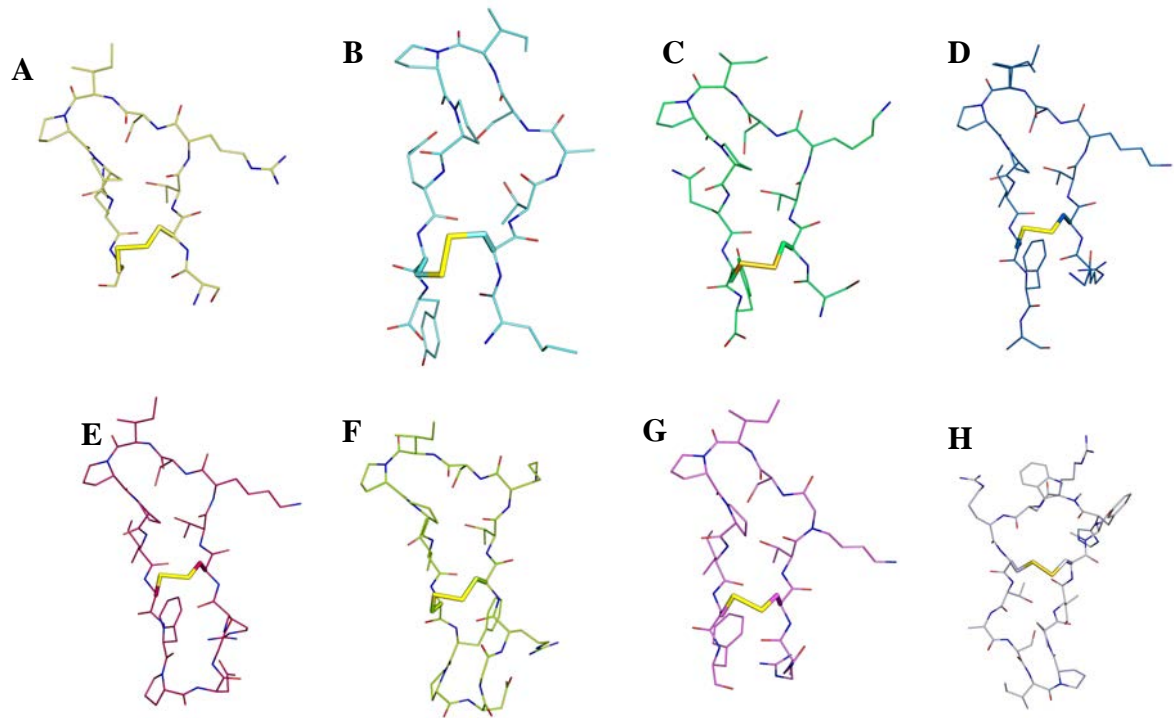
Os resíduos que desempenham papel importante no aspecto estrutura e função dos peptídeos sintéticos derivados de BBIs foram mapeados a partir das sequências dos *loops* inibitórios de proteínas conhecidas (Figura 13). As modificações nas posições P3 a P6' em peptídeos sintéticos demonstrou que os resíduos na posição P2, P1, P2' e P3' são os resíduos de maior interação com a proteína e conseqüentemente os mais importantes para a inibição (Descours, A. *et al*, 2002).

Uma prolina na configuração *cis* na posição P3' é conservada em todas as proteínas do tipo BBI (McBride, J. D, *et al*, 1998). De acordo Brauer, mutações pontuais na sequência dos inibidores demonstraram que a substituição da *cis*-Pro-P3' por alanina foi capaz de alterar a atividade (Brauer, A. *et. al.*, 2001) mostrando a importância do resíduo na posição específica. Embora uma prolina na posição P4' não seja essencial para a atividade, ela estabiliza efetivamente a conformação *cis*-Pro (Brauer, A. *et. al.*, 2001). O *loop* reativo também possui um aminoácido de treonina na posição P2 altamente conservado. Verificou que a treonina na posição P2 era o resíduo ideal por apresentar interações de hidrogênio *intra-loop* e interações hidrofóbicas com a enzima (Brauer AB, *et al.*, 2003; Song HK *et al.*, 1999).

Estruturas de alguns peptídeos da família BBI foram resolvidas por ressonância magnética nuclear (RMN), mostrando que os peptídeos são estruturados em solução (Pavone, V, *et. al.*, 1994; Li, Y *et. al.*, 1994). Estruturas do complexo entre peptídeo e tripsina foram determinadas por difração de raios X, mostrando que o peptídeo derivado adota a mesma conformação quando ligado à protease. A conservação da estrutura nos peptídeos sintéticos explica a sua atividade de inibição (Li, Y *et. al.*, 1994) (Figura 14).

		P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'		N*								
Pep_BTCI	- - - - -	C	T	K	S	I	P	P	Q	C	- - - - -	9								
PDB_1OX1_XTAL	- - - - -	S	C	T	R	S	I	P	P	Q	C	Y	- - - - -	11						
PDB_1HD9_RMN	- - - - -	X	C	T	A	S	I	P	P	Q	C	Y	- - - - -	11						
PDB_1GM2_RMN	- - - - -	S	C	T	K	S	I	P	P	Q	C	Y	- - - - -	11						
PDB_4XOJ_XTAL	- - - - -	G	R	C	T	K	S	I	P	P	I	C	F	P	- - - - -	13				
PDB_1SFI_XTAL	- - - - -	G	R	C	T	K	S	I	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_1JBL_RMN	- - - - -	X	R	C	T	K	S	I	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_4HGC_XTAL	- - - - -	G	R	C	T	X	S	I	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_6BVY_RMN	- - - - -	-	C	T	A	S	I	P	P	I	C	X	X	X	W	R	- - - - -	14		
PDB_6BVH_XTAL	- - - - -	G	T	C	T	R	S	I	P	P	I	C	N	P	N	- - - - -	14			
PDB_6BVU_RMN	- - - - -	-	C	T	A	S	I	P	P	I	C	H	X	R	W	R	- - - - -	14		
PDB_6BVW_RMN	- - - - -	-	C	T	A	S	I	P	P	I	C	H	X	X	X	R	- - - - -	14		
PDB_6D3Y_XTAL	- - - - -	G	R	C	T	K	S	R	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_1SMF_XTAL	E P C C D S	C	R	C	T	K	S	I	P	P	E	C	H	C	A	N	I	- - - - -	22	
PDB_1G9I_XTAL	E P C C D S	C	R	C	T	K	S	I	P	P	Q	C	H	C	A	N	I	- - - - -	22	
PDB_5VAV_RMN	- - - - -	G	R	C	T	Q	A	W	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_1O8Z_RMN	- - - - -	X	R	C	T	X	X	I	P	P	I	C	F	P	D	- - - - -	14			
PDB_2BEY_RMN	- - - - -	-	X	T	K	S	I	P	P	I	C	T	K	S	I	P	P	I	16	
PDB_5H1I_RMN	- - - - -	X	K	R	P	P	G	F	S	P	L	C	T	K	S	I	P	P	I	18

**Figura 13.** Alinhamento das seqüências dos peptídeos derivados de BBIs depositadas no PDB. As estruturas resolvidas por cristalografia estão descritas como XTAL e as resolvidas por ressonância magnética nuclear com RMN. N\*=número de resíduos na seqüência.



**Figura 14.** Estruturas dos peptídeos derivados dos BBIs depositadas no PDB. Cisteínas destacadas em amarelo e *sticks*. **A)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1OX1). **B)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1HD9). **C)** Peptídeo cíclico sintético com 11 resíduos (PDB - 1GM2). **D)** Peptídeo cíclico sintético com 13 resíduos (PDB - 4XOJ). **E)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1SFI). **F)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1JBL). **G)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 4HGC I). **H)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 1JBL). **G)** Peptídeo cíclico sintético com 14 resíduos (PDB - 6BVY).

### 1.3 Aplicações dos inibidores de protease

As proteases desencadeiam um evento irreversível, portanto, sua atividade deve ser controlada. Nesse contexto, os inibidores de proteases são importantes ferramentas da natureza para regular a atividade proteolítica de suas proteases alvo, para bloqueá-las em casos de emergência, ou para sinalizar interações ou eliminação de receptores (Turk, 2006). Como resultado, a natureza desenvolveu várias estratégias para controlar a proteólise, incluindo regulação espacial e temporal, ativação de zimogênio e degradação de protease por meio da inibição de proteases por inibidores macromoleculares (Farady C *et. al.*, 2010).

Inibidores sintéticos são amplamente utilizados para o estudo de proteases com o objetivo de criar uma nova intervenção terapêutica (Leung, D. *et. al.* 2000). Historicamente os primeiros estudos de inibidores de proteases foram estimulados pela busca de agentes biotecnológicos para a produção de variedades de plantas resistentes contra agentes externos (Richardson 1977; Ryan 1973), como foi descrito por testes *in vitro* realizados por Shewry e Lucas (Shewry e Lucas, 1997). Com o avanço da tecnologia, os inibidores de protease atingiram outro nível de finalidade, aplicados em diversas áreas, como, na agrônômica e na medicina (Fear *et. al.*, 2007).

Os estudos de BBIs têm atraído um grande interesse biotecnológico devido às suas múltiplas funções. Dentro desses estudos, as funções dos BBIs vão desde o controle de pragas em plantas transgênicas, até o aspecto clínico, incluindo desordens antineoplásicas, inflamatórias e alérgicas (Li, J., *et a*, 2007). Os inibidores BBI também têm sido descritos como agentes supressores de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), em diversos órgãos e tecidos (mama, cólon, fígado, pulmão, esôfago e epitélio oral), em células de origem hematopoiéticas e células do tecido epitelial e do tecido conjuntivo (Kennedy, 1998 a; Deryugina *et. al.*, 2002; Zucker *et. al.*, 2003).

BTCl apresentou efeitos *in vitro* e *in vivo* sobre o desenvolvimento de uma praga de algodão, conhecido como bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), por meio da inibição de proteases do tipo tripsina-*like* e quimotripsina-*like*. O inibidor foi capaz de provocar alterações morfológicas lesivas em larvas causando o atrasado no seu crescimento, e em insetos adultos diminuiu a população da praga, mostrando seu potencial de expressão em plantas transgênicas, projetadas para resistência a pragas (Franco *et. al.*, 2003).

De acordo com Carvalho e colaboradores, BTCl foi o primeiro BBI a apresentar efeitos na regulação da homeostase de fluidos, aumentando o fluxo urinário, na excreção fracionada de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Além disso, foi demonstrado que o BTCl apresenta atividade potencializadora da ação da guanilina, um peptídeo hipotensor, evidenciando efeitos no processo de filtração glomerular em ratos perfundidos (Carvalho F *et. al.*, 2008). Ambos os efeitos são devido à capacidade

do BTCl de inibir proteases do tipo quimotripsina-*like*, desempenhando assim função no metabolismo renal da guanilina em um processo natriurético (Carvalho F. *et. al.*, 2008).

Foi demonstrado que o BTCl pode atuar modulando a atividade da bradicinina e dos seus peptídeos análogos *in vivo*, prolongando a meia vida dos peptídeos na corrente sanguínea, auxiliando na ação cardiofisiológica e potencializando a ação hipotensora (da Cunha Morales Álvares, Alice *et al.* 2014).

De acordo com Joanniti e colaboradores, foi demonstrado que aplicações tópicas de BTCl em camundongos foram capazes de reduzir a incidência e o volume de lesões pré-malignas causadas por indução química de câncer de pele não melanoma (Joanitti GA *et. al.*, 2010). Especificamente, os efeitos preventivos da aplicação tópica de BTCl foram o retardo da progressão do câncer de pele não melanoma e a produção de mediadores inflamatórios envolvidos na progressão tumoral (Joanitti GA *et. al.*, 2010).

O BTCl induz efeitos citostáticos e citotóxicos em células cancerígenas de mama, linhagem MCF-7. Estes efeitos indicam morte celular por apoptose associada a alterações morfológicas, alterações do núcleo e mitocôndrias, aumento do número de células com potencial reduzido de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e células com integridade da membrana plasmática alterada (Joanitti GA *et. al.*, 2010). O BTCl foi caracterizado como um potente inibidor do proteassoma 20S, agindo na inibição a atividade proteolítica da enzima tripsina-*like* do proteassoma, induzindo, assim, efeitos citostáticos e citotóxicos em células de câncer de mama MCF-7 por indução de apoptose (Souza L da C *et. al.*, 2014). O BTCl inibe a atividade das proteases tripsina-*like*, quimotripsina-*like* e a caspase-*like* com constante de associação de  $1.0 \times 10^{-7}$  M,  $7.0 \times 10^{-7}$  M e  $14.0 \times 10^{-7}$  M, respectivamente. BTCl suprimiu a viabilidade celular de adenocarcinoma de mama humano inibindo a atividade do proteassomo 20S (A Mehdad *et. al.*, 2016).

## 2. Justificativa

Proteases desempenham função determinante em processos fisiopatológicos. Logo, o desequilíbrio das proteases pode implicar em várias consequências fisiopatológicas. Os inibidores de proteases são os principais sistemas de defesa em humanos e plantas ajudando a regular e equilibrar as atividades das proteases. Compreender os papéis que os inibidores de protease desempenham e conseqüentemente o controle da ação das proteases apresenta-se como uma oportunidade para o desenvolvimento de novos compostos com potencial biotecnológicos e/ou farmacêuticos (Turk, 2006; Abbenante, G., *et. al.*, 2005; Losso, JN, 2008).

Além da possibilidade no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos o estudo de inibidores de proteases provenientes de plantas é altamente relevante na área agrícola (Habib e Fazili, 2007). Em segundo plano, a interação entre protease e inibidor é um exemplo interessante e sistema de modelo útil para estudar as interações intermoleculares.

As aplicações dos inibidores de proteases têm sido exploradas no desenvolvimento de drogas (Turk, 2006). Têm sido reportados que algumas patologias como, a hipertensão, insuficiência cardíaca, algumas formas de câncer e alguns tipos vírus são mediadas por proteases (Wensing *et. al.*, 2010). Na literatura tem sido descrito alguns alvos de proteases bem estabelecidos, como a enzima conversora da angiotensina (ECA) e a protease do HIV (Arts EJ e Hazuda DJ. 2012). ECA é uma metaloprotease de zinco que atua como uma carboxipeptidase, sendo essa uma das proteases centrais no sistema renina-angiotensina. Inibidores da ECA são amplamente usados como fármacos no tratamento de doenças como pressão arterial elevada, insuficiência cardíaca, diabetes tipo I e diabetes tipo II (Hirsch, J. 2003). Outros exemplos importantes incluem o Argatroban da companhia GlaxoSmithKline, um inibidor de trombina que a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou para o tratamento de distúrbios de coagulação em 2000; o inibidor de DPP4 JANUVIA® (Sitagliptin) da Merck foi aprovado para o tratamento de diabetes em 2006; e VELCADE®



(Bortezomib), um inibidor de proteassoma da companhia Millennium, aprovado para o tratamento do mieloma múltiplo em 2003 (Chen D., *et al.* 2011).

Além de um potencial desenvolvimento de drogas, o controle das proteases e seus inibidores são descritos como biomarcadores na identificação, validação e diagnóstico de algumas doenças (Tamir, Ayala *et al.* 2016). As expressões diferenciadas de algumas proteases e seus respectivos inibidores em algumas doenças fazem com que esse sistema seja usado como biomarcadores no diagnóstico precoce e prognósticos permitindo uma escolha na terapia adequada. Um exemplo de biomarcador no câncer de mama é a serino protease ativadora de plasminogênio e seu inibidor PAI-1 (Look, M. P. e Foekens, J. A. 1999) e a serino protease prostatina (PRSS8) (Tamir, Ayala *et al.* 2016). Outro exemplo são as serino proteases relacionadas com calicreína (KLKs) que estão envolvidas em vários tipos de câncer. Foi demonstrado que as KLKs estavam superexpressas no câncer, o que as torna biomarcadores clinicamente relevantes para o prognóstico e o monitoramento (Goettig, Peter *et al.* 2010).

Como já foi descrito, o BTCl é um inibidor em potencial para aplicações biotecnológicas. O BTCl pode ser aplicado na área agrícola no controle de pragas, como o bicudo do algodoeiro (Franco *et al.*, 2003), na mediação de respostas inflamatórias (A Mehdad *et al.*, 2016), na inibição da subunidade 20S do proteassoma (Souza L da C *et al.*, 2014; A Mehdad *et al.*, 2016), na prevenção e no controle de células cancerígenas no tratamento de câncer de pele não melanoma e contra células cancerígenas do câncer de mama (Joanitti GA *et al.*, 2010) e também na regulação da homeostase (Carvalho F *et al.*, 2008) e como agente anti-hipertensivo (da Cunha Morales Álvares, Alice *et al.* 2014).

Mediante estas aplicações do BTCl e evidências na literatura demonstrando que os peptídeos derivados da família BBI conservam sua atividade inibitória e sua estrutura (Li, Y *et al.*, 1994, Zhu, G *et al.*, 2001, Brauer, A. *et al.*, 2001) o desenho racional de peptídeos derivados do BTCl, bem como o estudo da estrutura e função, são estratégias para fins biotecnológicos. Peptídeos cíclicos ricos em cisteínas têm sido descritos como de alto potencial para o desenho de drogas, devido à sua estabilidade estrutural (Wang, C. K., *et al.*,

2014). Alguns exemplos de peptídeos ricos em cisteína utilizados na produção de drogas estão relatados na literatura. Vc1.1 (cVc1.1) é um peptídeo com 22 resíduos contendo 2 ligações de dissulfeto (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>3</sup> e Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup>) derivado de um peptídeo do veneno do caramujo cone (*cone snail's*) (R. J. Clark *et al.*, 2010). O Kalata B1 (kB1) é um peptídeo derivado de ciclotídeos, uma família de peptídeos cíclicos de ocorrência natural que são caracterizados por um arranjo de ligação dissulfeto (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>5</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>) (D. J. Craik *et al.*, 1999).

Tendo em vista o crescente interesse em peptídeos cíclicos ricos em cisteínas, neste trabalho priorizamos o estudo estrutural do complexo de proteases com peptídeos derivados do BTCI por meio da determinação da estrutura tridimensional e testes de atividades destes complexos. A conservação da atividade de peptídeos derivados de outras moléculas (McBride J, D. e Leatherbarrow R,J., 2001) justifica o desenho de inibidores de protease altamente potentes derivados dos inibidores naturais. Portanto a utilização dos peptídeos derivados BTCI encontrados em sementes de *Vigna unguiculata*, para este estudo foi baseada nas informações citadas bem como na facilidade de obtenção por meio de síntese química, visando, futuramente o desenho de novos fármacos, considerando o potencial biotecnológico, conforme relatado.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Geral:**

Este trabalho tem como objetivo a resolução da estrutura tridimensional e análise da atividade dos peptídeos bioativos derivados do inibidor BTCl, em complexo com a tripsina por difração de raios X.

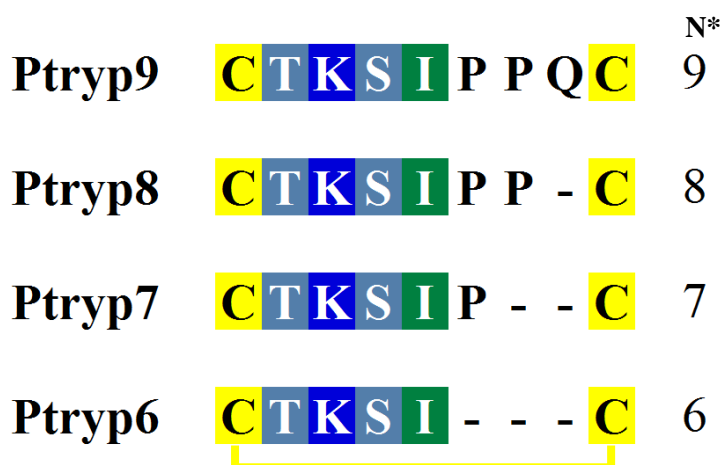
### **3.2 Específico:**

- Desenho dos peptídeos derivados do inibidor BTCl que interagem com tripsina.
- Aquisição e análise de pureza dos peptídeos que interagem com tripsina por espectrometria de massa.
- Análise da função inibitória dos peptídeos contra tripsina.
- Análise de polidispersividade por Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD).
- Testar condições de cristalização para os peptídeos e o complexo peptídeo-tripsina.
- Experimentos de difração e coleta de dados cristalográficos.
- Processamento dos dados cristalográficos.
- Construção dos modelos dos complexos entre os peptídeos e tripsina.
- Refinamento dos modelos cristalográficos.
- Validação dos modelos cristalográficos.
- Depósito das estruturas no PDB.
- Análise estrutural dos modelos.

## 4. Materias e Métodos

### 4.1 Desenhos dos peptídeos

Os peptídeos derivados foram desenhados conforme considerando diminuir seu tamanho entre 9 e 6 resíduos a partir do C-terminal (Figura 15). Os peptídeos derivados do BTC1 foram sintetizados e adquiridos de forma comercial junto à empresa Aminotech - Diadema, São Paulo. O ptryp9 é formado por 9 resíduos que correspondem ao *loop* reativo do BTC1, da Cys<sup>24</sup> à Cys<sup>32</sup> na sequência. Os demais peptídeos, de tamanho menor que o ptryp9, são os derivados do peptídeo original. Os peptídeos, ptryp8, ptryp7 e ptryp6 são uma redução no C-terminal do peptídeo original, sempre mantendo os peptídeos cíclicos pela ligação dissulfeto.



**Figura 15.** Alinhamento dos peptídeos derivados do BTC1 adquiridos. Os peptídeos denominados ptryp9, ptryp8, ptryp7 e ptryp6 foram desenhados para interagir com a tripsina. A linha amarela representa a ligação dissulfeto, fazendo com os peptídeos sejam cíclicos. Apesar de desenhada apenas para o ptryp6, todos os peptídeos possuem a ligação dissulfeto. N\*= número de aminoácidos na sequência.

## 4.2 Ensaio enzimático

As atividades inibitórias dos complexos, ptrypN-tripsina, foram avaliadas mediante análise das atividades tripsina (Sigma-Aldrich) usando o substrato N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma-Aldrich) (Erlanger, B. F., *et al*, 1961). As concentrações de tripsina utilizada no ensaio foram determinadas de medições de absorvância em um espectrofotômetro JASCO V-530 (JASCO, Tóquio, Japão). Usando os valores para tripsina de MM = 24 kDa e A1%<sub>280;1-cm</sub> = 15,9. Todos os componentes do ensaio foram diluídos em Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 8,2. O complexo ptrypN-tripsina foi formado pela incubação de 250  $\mu$ L de enzima a uma concentração inicial fixa (2,57  $\mu$ M para tripsina) com 250  $\mu$ L do ptrypN em várias concentrações à temperatura ambiente por 15 min. Após esta incubação, 1250  $\mu$ L de BAPNA a 0,064 mg/mL foram adicionados. A reação foi interrompida pela adição de 250  $\mu$ L de ácido acético a 30 %, levando a um volume final de 2 mL. A hidrólise enzimática do substrato foi avaliada por absorvância a  $\lambda$  = 410 nm. As atividades residuais das enzimas, na presença dos complexos, foram estimadas considerando a atividade enzimática sem inibidor como 100 %. Os valores obtidos são uma média de três medições independentes.

## 4.3 Análises da pureza e sequência dos peptídeos

As análises de pureza dos peptídeos foram feitas em com a colaboração do técnico do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (UnB). Os espectros de massa (MS e MS/MS) (Anexo I) foram adquiridos utilizando o equipamento MALDI Autoflex Speed TOF/TOF (Bruker Daltonics) operado no modo positivo refletivo. Uma mistura de peptídeos foi empregada na calibração externa do espectrômetro (Peptide Calibration Standard III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O equipamento foi controlado utilizando o software Flex Control versão 3.4 e as análises foram realizadas utilizando o software Flex Analysis (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas a partir de um volume correspondente a 1  $\mu$ L do peptídeo purificado, na molaridade

de 30 pM (solução contendo 5 % de acetonitrila em água), misturado a 3 µL de uma solução de  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). A mistura foi adicionada em duplicata diretamente na placa MALDI target plate MTP Ground Steel.

#### 4.4 Cristalização dos complexos

Os ensaios de cristalização para os complexos entre os peptídeos (ptryp9, ptryp8, ptryp7 e ptryp6) e tripsina foram realizados por cocrystalização. A tripsina liofilizada foi adquirida de forma comercial (Sigma-Aldrich, Alemanha) de pâncreas bovino (*Bos tauros*). Inicialmente a enzima tripsina foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 8,2 com o objetivo de diminuir a autólise. A enzima foi incubada com os respectivos peptídeos inibidores em gelo durante 1 hora, até o início dos ensaios de cristalização. Nos primeiros ensaios de cristalização a relação peptídeo/enzima foi de 2:1. Com o objetivo de ocupar todos os sítios da enzima pelo inibidor, essa proporção foi otimizada utilizando uma concentração de tripsina de 2,6 mM e concentração dos peptídeos de 51,5 mM, resultando na relação estequiométrica de peptídeo/tripsina de aproximadamente 20 vezes.

A cocrystalização dos complexos entre os peptídeos e tripsina foi feita pelo método de difusão de vapor em placas de gota sentada (*sitting drop*) ou gota pendurada (*hanging drop*) utilizando a metodologia de matriz esparsa (J. Jancarik e S.-H. Kim, 1991). Em busca das melhores condições de cocrystalização dos complexos, foram feitos *screenings* utilizando kits comerciais das empresas Hampton Research (Crystal screen I e II), Jena Bioscience (JCSG e PACT) e Molecular Dimension (JCSG e Morpheus). Os reagentes usados na cristalização em geral apresentam em sua composição química um agente precipitante. Os agentes precipitantes atuam com o objetivo de levar o sistema acima do ponto de saturação, fazendo com que a proteína se precipite de forma ordenada obtendo cristais.

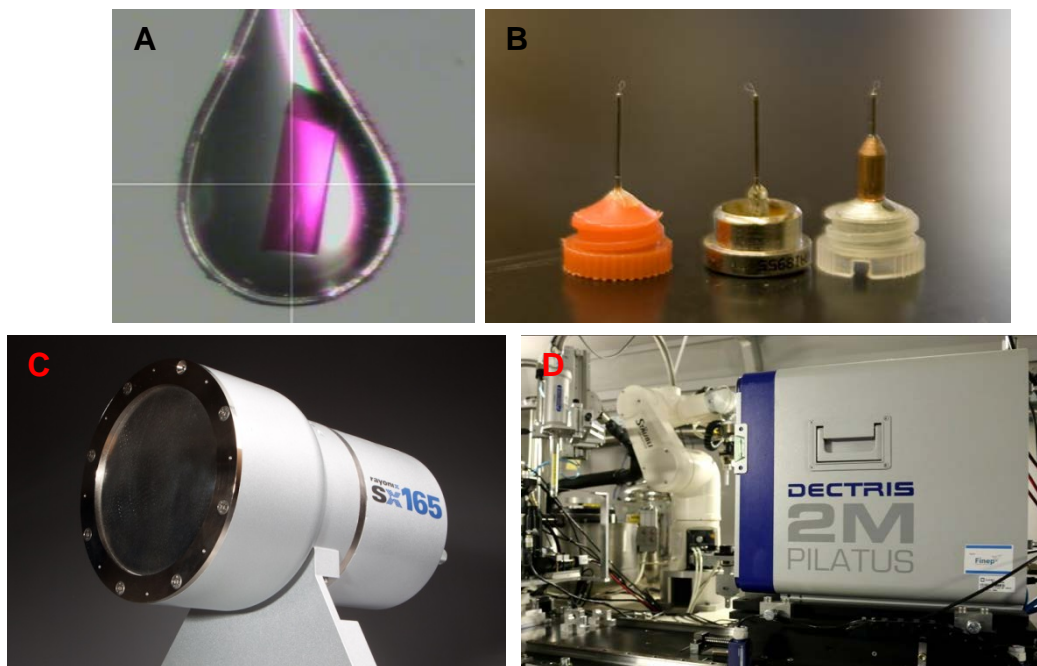
Os primeiros ensaios de cristalização foram feitos com auxílio de um robô (Mosquito Crystal Nanolitre Protein Crystallisation Robot, TTP Labtech, Reino Unido) em placas com 96 poços. As gotas de cristalização feitas com o auxílio do robô tinham um volume de 200 nL (100 nL reservatório + 100 nL complexo) equilibradas com 100 µL de volume no reservatório do poço. As placas de cristalização foram observadas em uma lupa com a menor perturbação possível, e mantidas em sala de temperatura controlada (20 °C). Posteriormente as condições ideais de cristalização foram otimizadas em placas manuais de 24 poços com volume das gotas de 3 µL (1,5 µL reservatório + 1,5 µL complexo) equilibradas com 500 µL do reservatório do poço.

## **4.5 Coleta de dados de difração e processamento dos dados**

Os cristais dos complexos entre os peptídeos (ptryp9, ptry8, ptry7 e ptry6) e a tripsina, foram submetidos à difração de raios X na linha MX-2 de macromoléculas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas - São Paulo). A linha de luz do LNLS tem uma faixa de um comprimento de onda de 0,83 a 2,48 Å. O maior fluxo de elétrons na linha é o de 1,45 Å ou 8550,6379 elétrons volt (eV). Visando a proteção dos cristais no momento da difração, alguns cristais foram imersos em uma solução crioprotetora formulada de acordo com a solução na qual o complexo foi cristalizado (McFerrin e H. Snell, 2002). Os cristais foram retirados das gotas com o auxílio de um *loop* e colocados na linha de difração com um fluxo contínuo de nitrogênio a 100 K e expostos aos raios X. O fluxo contínuo de nitrogênio tem o objetivo de prolongar a vida do cristal frente aos danos provocados pelos raios X.

No experimento de difração, medimos as intensidades dos pontos de difração correspondentes aos feixes de raios X difratados. Os detectores MarCCD SX165 (Rayonix, LLC - USA) e Pilatus 2M (Dectris - SWI) foram usados na coleta de dados de intensidade e direção dos feixes difratados. Nas primeiras coletas de dados foi usado o MarCCD SX165 (Figura 16C). Posteriormente a linha MX-2 do

LNLS sofreu uma otimização passando a usar o detector Pilatus 2M (Dectris) (Figura 16D).



**Figura 16.** **A)** Cristal usado na coleta de dados. **B)** Loops usados para coletar os cristais. **C)** Detector Rayonix MarCCD SX165. **D)** Detector Dectris Pilatus 2M.

A coleta foi feita com oscilação de  $0,5^\circ$  por imagem. A difração de raios X gera as imagens com o padrão de difração com as intensidades. Duas informações podem ser encontradas nas reflexões (pontos de difração) das imagens de difração. A primeira vem do arranjo geométrico das reflexões, que fornece toda a informação sobre a rede cristalina e sua simetria do cristal. A segunda vem da intensidade da reflexão que dá parte da informação sobre o conteúdo da rede. Durante a indexação, os pontos devem ser encontrados, nomeados com números inteiros ( $h, k, l$  = índices de Miller) e a geometria do cristal deve ser determinada com precisão para que as intensidades possam ser integradas. Parte dos valores de intensidade ( $I$ ) e de  $I/\sigma$  são determinados e armazenados para a determinação dos parâmetros cristalográficos. Durante o escalonamento, os valores integrados das diferentes imagens coletadas no experimento de difração são combinados em um conjunto de fatores de estrutura e normalizados, também de acordo com a simetria. Os processamentos de dados, indexação, integração e escalonamento, foram feitos utilizando os programas XDS (W. Kabsch, 2010) e o pacote computacional CCP4 (M. D. Winn *et al.* 2011),



para determinar os parâmetros da célula unitária, grupo espacial e para calcular o *coefficient matthews* para determinar quantas moléculas estão presentes na unidade assimétrica.

Para buscar as fases iniciais do modelo foi utilizado o método de Substituição Molecular (MR) (Rossmann, M. G. 1990), utilizando o programa PHASER (A.J. McCoy, *et. al.*, 2007). O modelo de busca para a tripsina foi o PDB 2G81 (Barbosa *et. al.*, 2007).

## **4.6 Refinamento e construção dos modelos cristalográficos**

O resultado de um experimento cristalográfico não é realmente uma imagem dos átomos, mas um mapa da distribuição de elétrons na molécula, ou seja, um mapa de densidade eletrônica. O processo de refinamento geralmente envolve ciclos alternados de otimização automatizada e correções manuais que melhoram a concordância dos modelos com os mapas de densidade eletrônica. Essas correções manuais durante a construção dos modelos requer o uso de programas de computação gráfica. O programa *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* (COOT) (P. Emsley *et. al.*, 2010) foi o programa usado para exibir e manipular modelos atômicos das biomacromoléculas e fazer o ajuste dos átomos na densidade eletrônica. Alguns parâmetros como restrição geométrica, comprimento de ligação química, ângulos de torção da cadeia principal e contatos próximos são levados em conta na hora da construção do modelo cristalográfico. O pacote computacional *Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography* (PHENIX) (P.V. Afonine *et. al.*, 2012) é um sistema altamente automatizado para determinação de estruturas. O refinamento macromolecular automatizado (phenix.refine) foi a metodologia utilizada para o refinamento da estrutura e construção dos mapas.

O PyMOL é pacote computacional de sistema de visualizações moleculares e análises estruturais. PyMOL pode produzir imagens de alta qualidade de

pequenas moléculas e de biomacromoléculas, como as proteínas. Todas as imagens geradas nesse trabalho foram feitas utilizando o programa PyMOL (Schrodinger, 2015).

## 4.7 Validação da estrutura e análise da interface

Os relatórios de validação das estruturas resolvidas foram gerados pelo wwPDB (Read *et al.*, 2011). O relatório resume a qualidade da estrutura e destacam pontos específicos, considerando o modelo atômico, os dados de difração e o ajuste entre o modelo atômico e os dados de difração (Gore *et al.*, 2012; Gore *et al.*, 2017).

Os fatores R ( $R_{\text{free}}$  e  $R_{\text{work}}$ ) são medidas em que um modelo cristalográfico responde pelos dados experimentais originais correspondentes as intensidades medidas de reflexões no padrão de difração. Os fatores R são importantes indicadores de progresso no refinamento dos modelos cristalográficos, e os valores finais dos fatores de R são critérios usados na validação para avaliar a concordância entre os dados calculados (do modelo) e os dados observados (medidos).

$R_{\text{work}}$  é uma medida de concordância entre o modelo cristalográfico e os dados originais de difração de raios X.  $R_{\text{work}}$  é um calculado a partir do modelo, gerando a intensidade esperada de cada reflexão no padrão de difração e, em seguida, compara esses "dados" calculados com os dados experimentais, que consistem em posições e intensidades medidas. Dados de validação devem estar livres dos efeitos de "super ajuste" da estrutura.

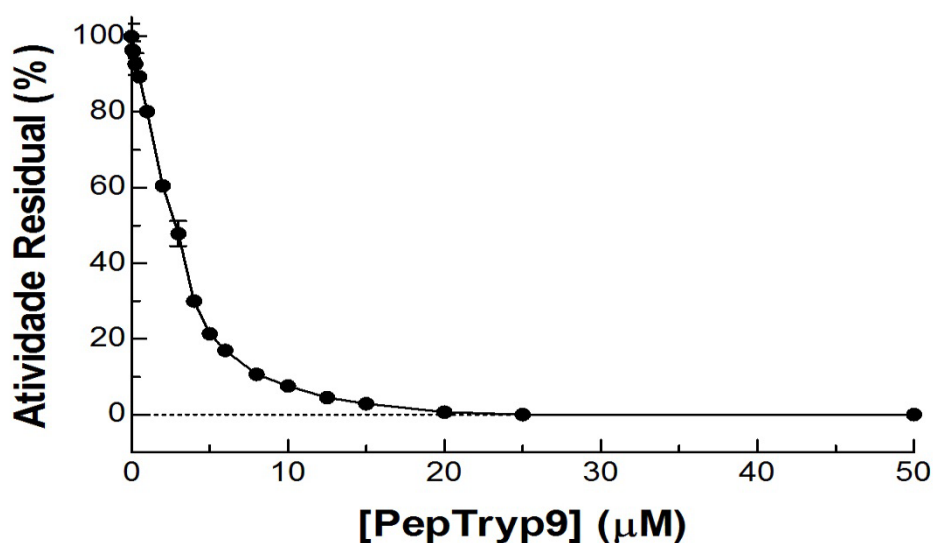
$R_{\text{free}}$  é uma medida do ajuste do modelo a um pequeno subconjunto dos dados experimentais que não foi usado no refinamento do modelo (Brünger, 1992). O valor citado foi feito pelo programa DCC (Yang *et al.*, 2016). O clash score do modelo é o número de pares de átomos que estão incomumente próximos um do outro e foi calculada pelo MolProbity (Chen *et al.*, 2010). A posição dos átomos e de seus ângulos de torção phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) é apresentando no gráfico de Ramachandran. As posições dos resíduos e seus rotâmeros foram

avaliados pelo MolProbity (Chen *et al.*, 2010). As estatísticas de qualidade foram calculadas usando compilações padrão de parâmetros de geometria covalente (Engh & Huber, 2001; Parkinson *et al.*, 1996), MolProbity (Chen *et al.*, 2010), Validation-pack (Feng *et al.*) e o dicionário do componente químico wwPDB (Read *et al.*, 2011). Os mapas de densidade de elétrons foram calculados pelo REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011). A análise da interface da enzima com os inibidores foi realizada para todos os modelos obtidos usando o software PDBePISA (*Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies*) (E. Krissinel e K. Henrick, 2007).

## 5. Resultados e Discussão

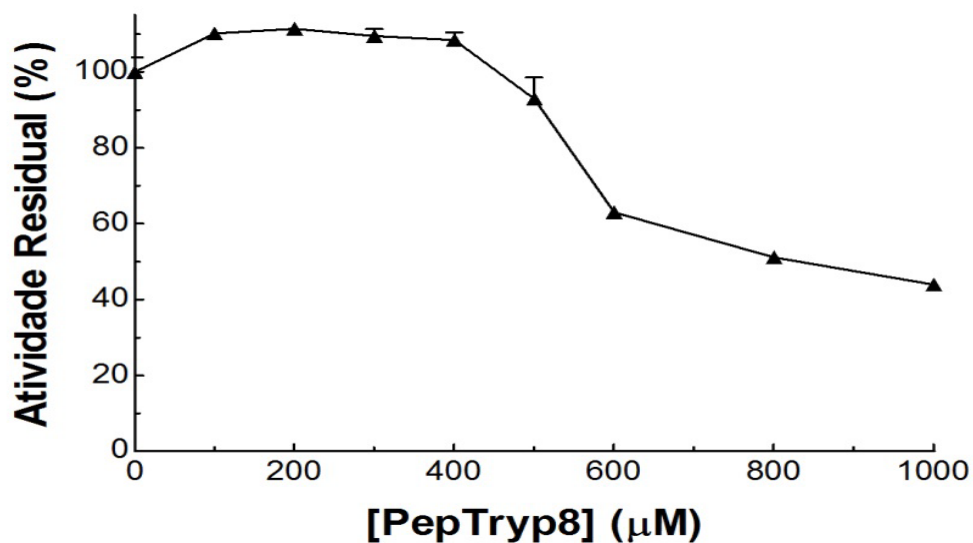
### 5.1 Ensaio enzimáticos

Foram realizados testes de inibição enzimática para todos os peptídeos sintéticos desenhados. Visando padronizar os testes enzimáticos uma ordem dos peptídeos foi preestabelecida. O primeiro a ser testado foi o peptídeo original, ptryp9 (CTKSIPPQC), com 9 resíduos, cíclico, representando o *loop* original do BTC1. O ptryp9 apresentou uma atividade inibitória no nível de  $\mu\text{M}$ . Um gráfico foi feito demonstrando a atividade residual vs concentração de peptídeo (Figura 17). O peptídeo ptryp9 precisou de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  para a inibição total da atividade da tripsina.



**Figura 17.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp9.

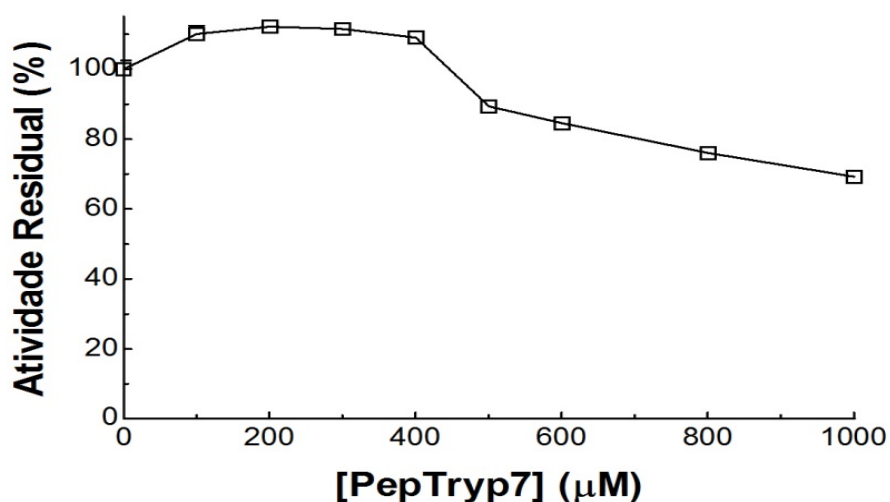
O segundo peptídeo testado foi o peptídeo ptryp8 com 8 resíduos (CTKSIPPC). A redução de um resíduo no C-terminal do peptídeo claramente modificou sua atividade e sua capacidade de inibir a protease como pode ser visto no resultado do ensaio enzimático do ptryp8 em complexo com a tripsina (Figura 18).



**Figura 18.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp8.

A atividade do ptryp8 demonstrou que mesmo na presença de grandes concentrações de peptídeo não foi capaz de inibir a tripsina 100 %. O ptryp8 começou a apresentar alguma atividade inibitória com valor aproximado de 0,5 mM, inibindo 10 % da atividade da tripsina. Os ensaios de inibição da tripsina pelo ptryp8 demonstraram que o peptídeo necessita de uma concentração de aproximadamente de 0,8 mM para inibir 50 % da atividade residual da tripsina.

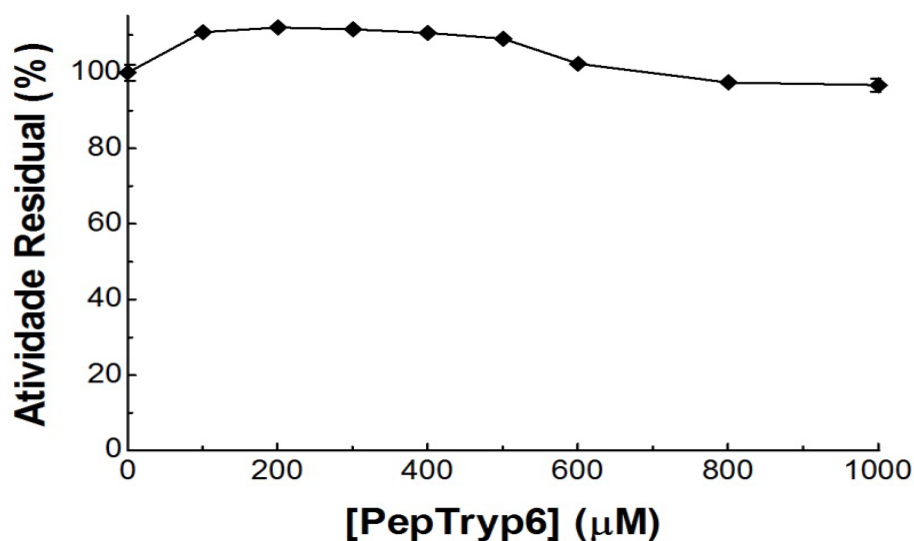
O terceiro peptídeo testado foi o ptryp7 (CTKSIPC) (figura 19). O ptryp7 apresenta em sua sequência 2 resíduos a menos no C-terminal do que o peptídeo ptryp9.



**Figura 19.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp7.

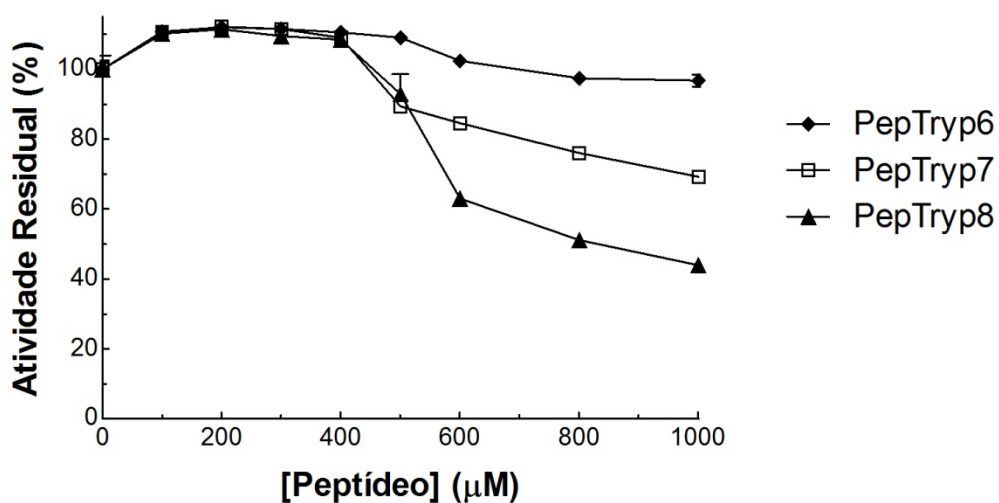
Assim como no ptryp8, ptryp7 não apresentou atividade inibitória suficiente para inibir 100 % da tripsina, demonstrando que a redução de 2 resíduos na sequência do ptryp7 afetou a atividade e conseqüentemente a sua capacidade de inibição. O ptryp7 começou a apresentar um efeito inibitório em uma concentração de aproximadamente 0,5 mM inibindo 10 % da tripsina. Para a inibição de 20% da tripsina foi necessária uma concentração de aproximadamente 0,7 mM. Os ensaios de inibição do ptryp7 apresentaram um valor máximo de inibição de 30 % da atividade da tripsina com uma concentração de 1 mM de ptryp7.

O último peptídeo testado foi o ptryp6 (CTKSIC). O ptryp6 apresenta em sua sequência 3 resíduos a menos do que o ptryp9. Os dados do ensaio enzimático do ptryp6 nos mostram que a redução na sequência do ptryp6 resultou em uma total perda de atividade inibitória (Figura 20).



**Figura 20.** Atividade enzimática da tripsina em complexo com ptryp6.

Os peptídeos que sofreram uma redução na sua sequência demonstraram que sua atividade inibitória foi diminuída (ptryp8 e ptryp7) ou perdida (ptryp6). Dos peptídeos sintéticos derivados do BTC1, o ptryp8 foi o segundo a apresentar uma melhor atividade inibitória, porém, necessitando uma alta concentração de aproximadamente 0,8 mM para inibir 50 % da atividade da tripsina. O ptryp7 precisou de uma concentração de 1 mM para inibir 30 % da tripsina. O ptryp6 não apresentou atividade inibitória contra tripsina. De acordo com a atividade dos peptídeos que tiveram sua sequência modificada pode se notar uma escala de atividade, onde, ptryp8 > ptryp7 > ptryp6 (Figura 21).



**Figura 21.** Atividade dos peptídeos ptryp8, ptryp7 e ptryp6.

De todos os peptídeos testados o ptryp9 se apresentou como o melhor peptídeo em comparação com os demais. A concentração do ptryp9 que foi necessária para inibir a 50 % da enzima ( $IC_{50}$ ) apresentou um valor de 2,47  $\mu$ M (Figura 21).

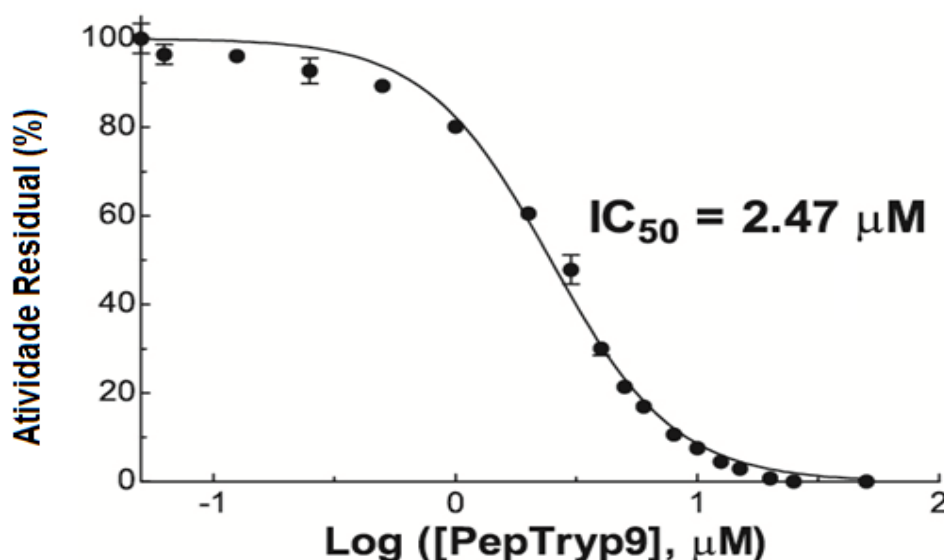


Figura 22.  $IC_{50}$  do ptryp9.

A perda de atividade pela redução de sequência também foi observada nos peptídeos derivados de SFTI-1 (Descours, A. *et al*, 2002). Uma hipótese para a perda de atividade é de que a alteração na sequência consenso dos *loops* inibitórios derivados dos BBIs ocasiona uma redução nos contatos entre o inibidor e a enzima.

Os resultados de inibição enzimática demonstram que o ptryp9 conserva alguma atividade do BTCI. Esses dados são similares aos resultados de peptídeos sintéticos derivados de BBIs que conservaram alguma atividade inibitória da proteína de origem (Nishino, N.*et al.*, 1975; Nishino, N, *et al.*, 1977; Terada, S, *et al.*, 1978; Li, Y. L. *et al*, 1994; Zhu, G. *et al*, 2001; Brauer, A. *et al.*, 2001).

A conservação da inibição pelo ptryp9 pode ser observada em uma comparação com o BTCI. Ensaios realizados por Fachetti demonstraram que o



BTCl inibe totalmente a tripsina em uma concentração de 6  $\mu\text{M}$  (M.K. Fachetti e Ventura MM, 1984). Os resultados de inibição da tripsina pelo BTCl evidenciam que o ptryp9 é um inibidor aproximadamente 3 vezes menos potente que o BTCl, porém, apresenta uma conservação na sua atividade inibitória dentro da mesma ordem de grandeza.

## 5.2 Complexo ptryp9 e tripsina

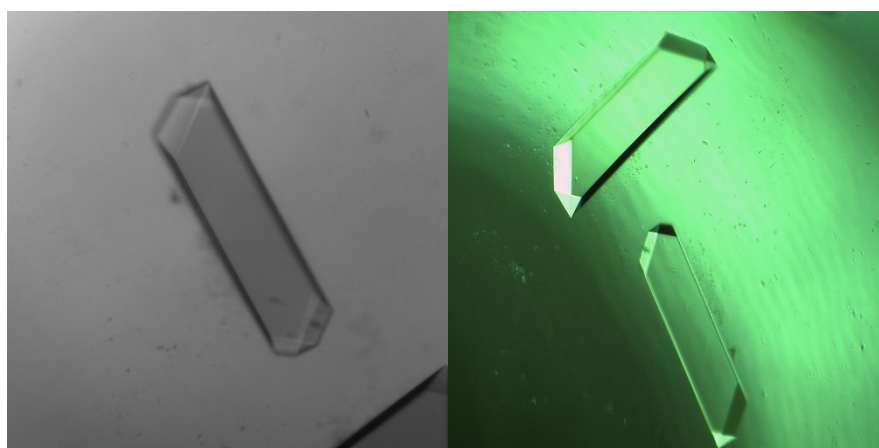
### 5.2.1 Cristalização do complexo e coleta de dados

Os primeiros testes de cristalização indicaram condições promissoras para a cristalização do complexo ptryp9 e tripsina. As condições de cristalização foram melhoradas com o objetivo de obter monocristais adequados para o experimento de difração de raios X. Os cristais do complexo ptryp9 e tripsina foram obtidos em diversas condições (Tabela 3).

**Tabela 3.** Condições de cristalização do complexo ptryp9 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

Cristal	Condição de cristalização	Crioproteção
ptryp9_1	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
ptryp9_2	Acetato de magnésio tetra hidratado 0,2 M; cacodilato de sódio tri hidratado 0,1 M pH 6,5; 20 % w/v polietilenoglicol 8000	10 % de glicerol
ptryp9_3	TRIS hidrocloreto 0,1 M pH 8,5; sulfato de amônio 2,0 M	
ptryp9_4	TRIS hidrocloreto 0,1 M pH 8,5; sulfato de amônio 2,0 M	
ptryp9_5	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1 M	
ptryp9_6	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1 M	

Os melhores cristais do complexo entre o ptryp9 e a tripsina foram obtidos na condição de HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1 M apresentando uma dimensão de aproximadamente de 0,2 mm X 0,1 mm (Figura 23).



**Figura 23.** Imagens dos cristais do complexo entre ptryp9 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M, HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

Os cristais obtidos foram levados ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas, SP) e submetidos ao experimento de difração de raios X na linha de biomacromoléculas MX-2 e coletados os dados cristalográficos (Tabela 4). As coletas dos dados foram feitas em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ) com o objetivo de obter a maior resolução dos complexos e assim um maior detalhamento atômico da estrutura. Os padrões de difração obtidos foram processados e a resolução máxima foi definida (Tabela 5).

**Tabela 4.** Dados da coleta do complexo Ptryp9 com tripsina.

Conjunto	Comprimento de onda (Å)	Detector	Grupo espacial
ptryp9_1	1,20	MarCCD SX165	$P2_12_12_1$
ptryp9_2	1,30	MarCCD SX165	$P2_12_12_1$
ptryp9_3	1,24	Pilatus 2M	$P3_221$
ptryp9_4	1,24	Pilatus 2M	$P3_221$
ptryp9_5	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
ptryp9_6	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$

Foram usados dois detectores diferentes na coleta de dados entre o complexo ptryp9 e tripsina (Tabela 4). O detector MarCCD SX165 tem uma área de 21000 mm<sup>2</sup> e o detector Pilatus 2M uma área de 73268,56 mm<sup>2</sup>. Uma melhor coleta de dados foi possível devido à maior área do detector Pilatus 2M.

Durante o processamento de dados foi notado que o ptryp9 em complexo com a tripsina foi cristalizado em dois grupos espaciais diferentes, ortorrômbico  $P2_12_12_1$  e trigonal  $P3_221$  (Tabela 4).

Inicialmente todos os conjuntos coletados foram processados com o objetivo da visualização do peptídeo ptryp9 no sítio ativo da tripsina. Após o processamento foi notado que o peptídeo estava presente no sítio ativo da tripsina em todos os conjuntos coletados. Com a certificação de que o peptídeo estava no sítio ativo da enzima, o parâmetro de escolha de qual conjunto seria refinado foi baseado em uma tabela cristalográfica com os dados estatísticos do processamento (Tabela 5). Em todos os conjuntos processados apresentaram

uma multiplicidade maior que 2,5 na última camada de resolução e maior que 3 no geral, demonstrando que a mesma intensidade foi medida ao menos 2 vezes. As *completezas* dos conjuntos coletados apresentam um valor maior que 90 % na média geral dos dados. De acordo com Wlodawer sugere-se que um conjunto de dados de difração de alta qualidade os valores globais de  $R_{meas}$  devem ser menores que 4 % a 5 % (Wlodawer, A., *et al.*,2013). O processamento de dados dos conjuntos do ptryp9 mostrou os valores de  $R_{meas}$  estarem similares aos sugerido por Wlodawer (Tabela 5).

**Tabela 5.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp9 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

Conjunto	Resolução máxima (Å)	Reflexões Obs - Únicas	Multiplicidade	Completeza (%)	$I/\sigma$	$R_{meas}$ (%)	CC (1/2)
Ptryp9_1	1,37	801430 - 108603 (116443 - 16668)	7,4 (7,0)	98,7 (93,8)	20,48 (4,46)	5,9 (46,6)	99,9 (93,0)
Ptryp9_2	1,48	314747 - 85533 (44751 - 12921)	3,7 (3,5)	98,4 (91,7)	15,51 (3,52)	5,6 (48,4)	99,8 (89,2)
<b>Ptryp9_3</b>	1,61	121798 - 48745 (18376 - 7751)	4,7 (4,4)	97,4 (92,6)	12,78 (1,39)	5,6 (48,4)	99,8 (89,2)
Ptryp9_4	1,61	123312 - 48679 (18764 - 7749)	2,5 (2,4)	97,2 (95,1)	13,42 (1,49)	4,8 (65,5)	99,9 (72,8)
<b>Ptryp9_5</b>	1,15	1160886 - 158504 (65039 - 19360)	13,9 (5,6)	93,7 (69,3)	29,60 (1,12)	5,2 (90,6)	99,9 (73,3)
Ptryp9_6	1,15	1082421 - 163865 (48518 - 17775)	6,6 (2,7)	92,0 (61,6)	14,68 (0,75)	6,5 (123,6)	99,9 (74,0)

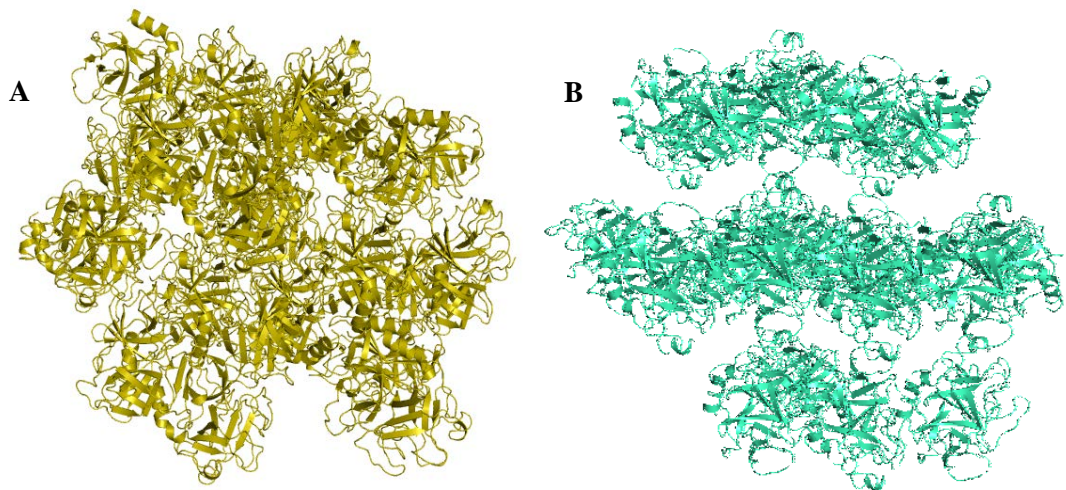
Os conjuntos ptryp9\_1 e ptryp9\_5 processados no grupo espacial  $P2_12_12_1$  foram os conjuntos que melhor apresentaram valores estatísticos de processamento (Tabela 5). Devido à coleta do conjunto ptryp9\_1 ter sido feita no detector MarCCD SX165 as reflexões de alta resolução foram perdidas, com isso o conjunto ptryp9\_5 foi o conjunto escolhido para o refinamento e construção do modelo cristalográfico do complexo (Tabela 4). O sistema cristalino do grupo espacial  $P2_12_12_1$  é ortorrômbico com parâmetros de célula unitária de  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  e  $a = 59,83$ ,  $b = 61,57$  e  $c = 67,03$  Å.

Os conjuntos ptryp9\_3 e ptryp9\_4 foram processados no grupo espacial  $P3_221$ . Para uma comparação e avaliação do melhor conjunto no grupo espacial trigonal, todos foram processados na mesma faixa de resolução (1,61 Å) (Tabela 5). Devido a semelhança nas estatísticas do processamento, tomou-se a multiplicidade que apresentava maior variação como critério para escolha do conjunto ptryp9\_3 para o refinamento e construção do modelo cristalográfico. O grupo espacial  $P3_221$  é trigonal com parâmetros de célula unitária de  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$  e  $a = b = 68,70$  e  $c = 74,58$  Å.

Os conjuntos cristalográficos ptryp\_3 e ptryp9\_5 apresentaram uma resolução máxima de 1,61 Å e 1,15 Å respectivamente. O conjunto ptryp9\_5 do complexo apresenta resolução superior aos demais conjuntos coletados. Uma resolução mais alta dos dados significa um maior ordenamento das moléculas dentro do cristal, assim, possibilitando uma melhor medida da difração dos átomos. Uma maior resolução proporciona melhores mapas de densidade de eletrônica, o que, por sua vez, significa maior precisão das posições atômicas na estrutura (Urzhumtsev, Alexandre *et al*, 2014).

### **5.2.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptrp9 e tripsina**

As moléculas em cristais de proteína são organizadas em redes cristalinas de três dimensões de forma repetitiva ao longo do cristal. Cristais de proteína são altamente hidratados devido à água ser necessária para a integridade estrutural das proteínas nativas e à impossibilidade de se ajustar as moléculas de maneira a preencher todo o espaço. Os canais de solvente formados ao longo dos cristais no grupo espacial ortorrômbico e trigonal são mostrados na figura 24.



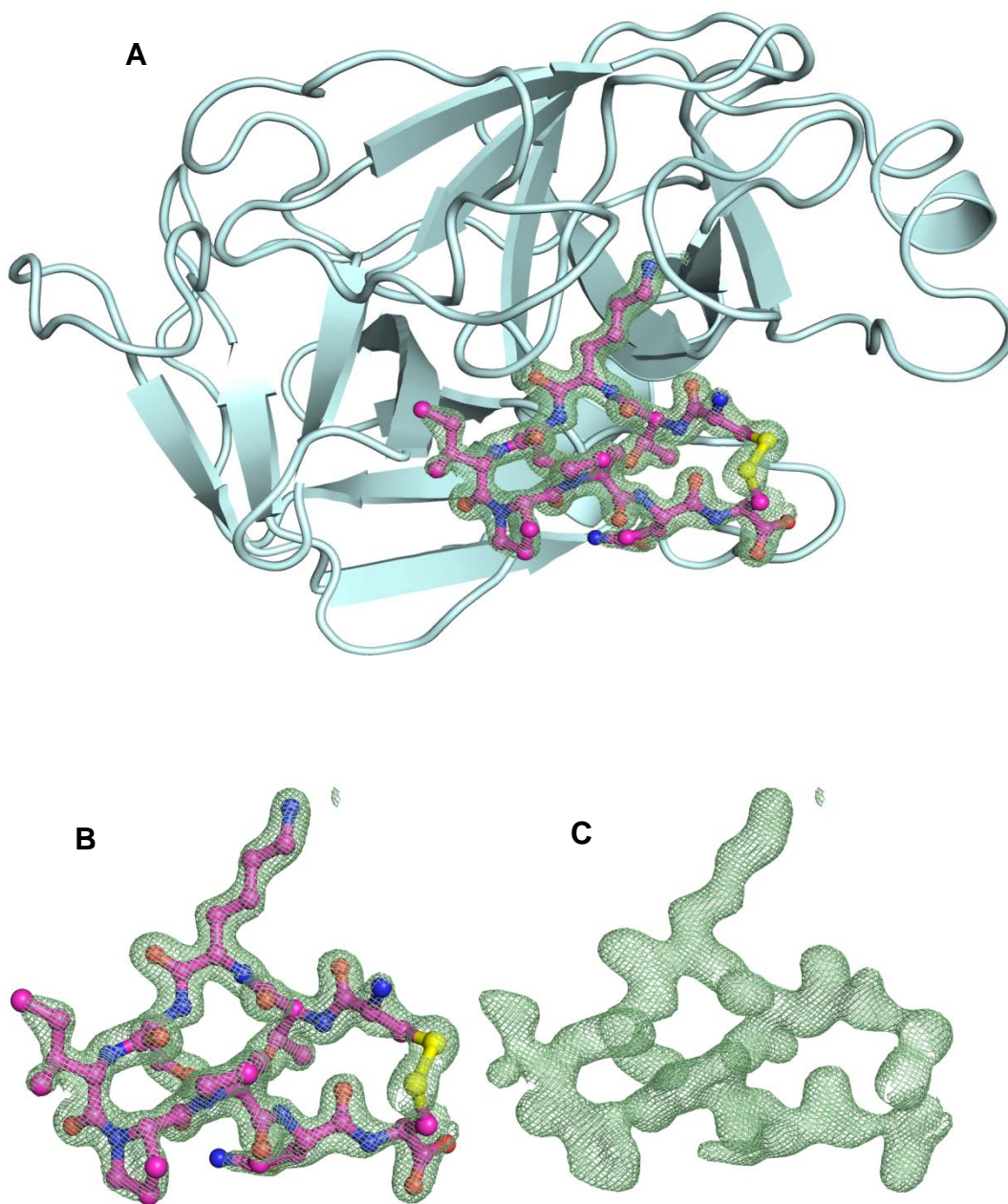
**Figura 24.** Empacotamento cristalino e os canais de solvente. Os canais estão demonstrados pelo espaçamento entre as proteínas. **A)** Empacotamento cristalino no grupo espacial trigonal  $P3_221$ . **B)** Empacotamento cristalino no grupo espacial ortorrômbico  $P2_12_12_1$ .

O modelo tridimensional do conjunto ptryp9\_3 foi construído (Figura 25) e sua tabela cristalográfica é mostrada na Tabela 6. O conjunto ptryp9\_3 foi coletado com um  $\lambda = 1,24 \text{ \AA}$ . Os valores de  $R_{\text{work}}$  e  $R_{\text{free}}$  apresentam valores de 0,156 e 0,188, respectivamente.

O modelo tridimensional do conjunto ptryp9\_5 foi construído (Figura 26) e sua tabela cristalográfica é mostrada na Tabela 6. O conjunto de dados do complexo ptryp9\_5 foi coletado com um  $\lambda = 1,20 \text{ \AA}$ . Os valores de  $R_{\text{work}}$  e  $R_{\text{free}}$  foram de 0,145 e 0,156 respectivamente.

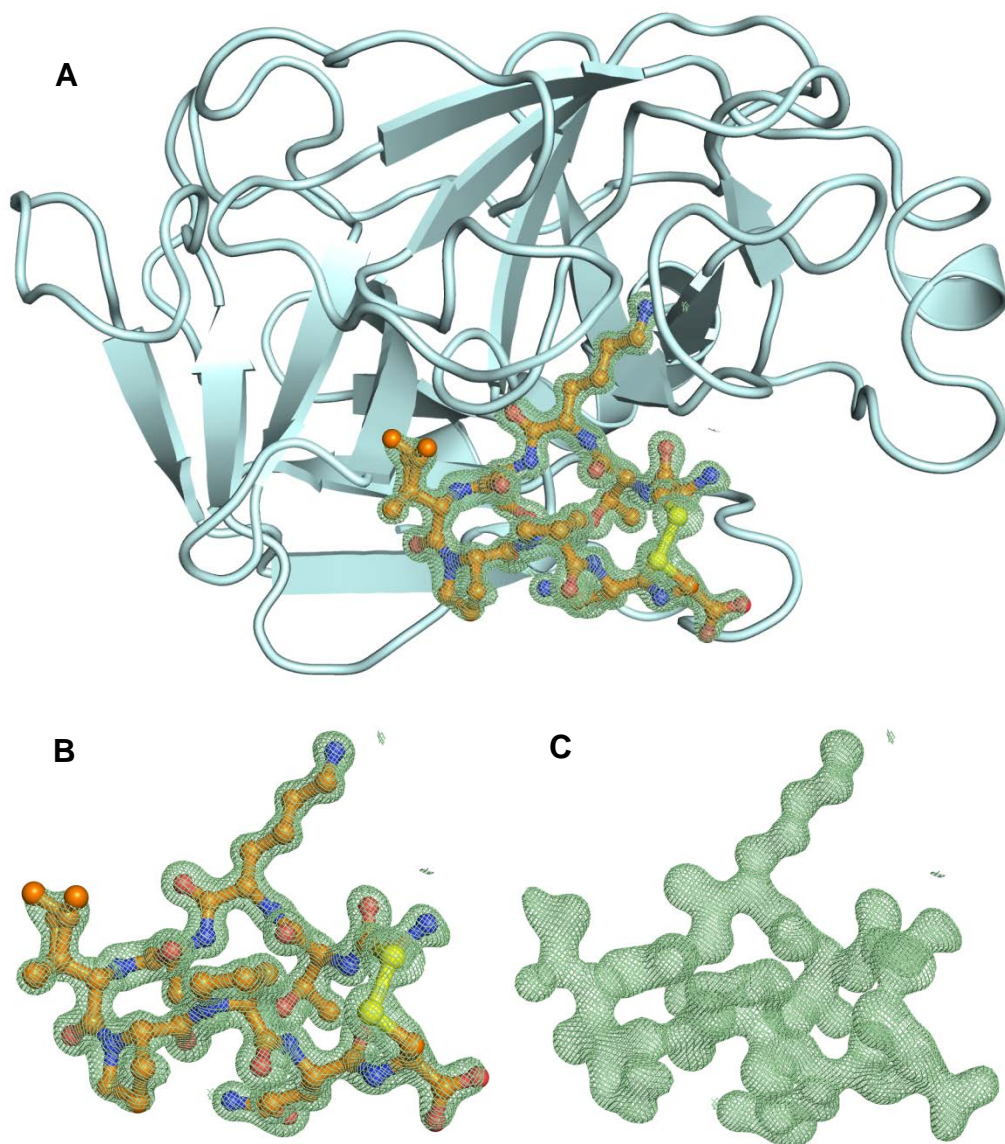
De acordo Wlodawer espera se para que estruturas resolvidas tenham um valor de  $R_{\text{free/work}}$  menor que 0,20 nesta faixa de resolução, o que é observado para as estruturas dos conjuntos ptryp9\_3 e ptryp9\_5 (Wlodawer, A., *et al.*,2007). Quando a diferença entre  $R_{\text{free}}$  e  $R_{\text{work}}$  excede um valor de 0,10 indica possível supervalorização dos dados experimentais (Wlodawer, A., *et al.*,2007). A diferença máxima entre os valores de  $R_{\text{free}}$  e  $R_{\text{work}}$  é de 0,032, estando dentro dos valores sugeridos por Wlodawer.

Os valores de comprimento de ligação e ângulos de ligação são parâmetros utilizados para avaliar a estereoquímica do modelo cristalográfico (Jaskolski M, et al., 2007). Esses valores esperados já estão descritos devidos a medições dos parâmetros em modelos de alta resolução de pequenas moléculas (Engh R e Huber R, 2001). Computando a estatística global destes parâmetros pela *root mean square deviation* (RMSD) dos valores esperados, um modelo cristalográfico de alta qualidade deverá apresentar valores de RMS de ligação menor que 0,02 Å e RMS de ângulo menor que 2° (Engh RA e Huber R, 2001). Os valores de RMS de ligação e de ângulos para os conjuntos ptryp9\_3 e ptryp9\_5 estão descritos na tabela 6. Os valores de RMS de ligação e RMS de ângulo para o conjunto são de 0,009 Å e 1,24° e 0,024 Å e 1,45° para os conjuntos ptryp9\_3 e ptryp9\_5, respectivamente.



**Figura 25.** Modelo tridimensional do complexo ptryp9 e tripsina no grupo espacial  $P3_221$ . **A)** Modelo do complexo entre ptryp9\_3 (magenta) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp9 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.





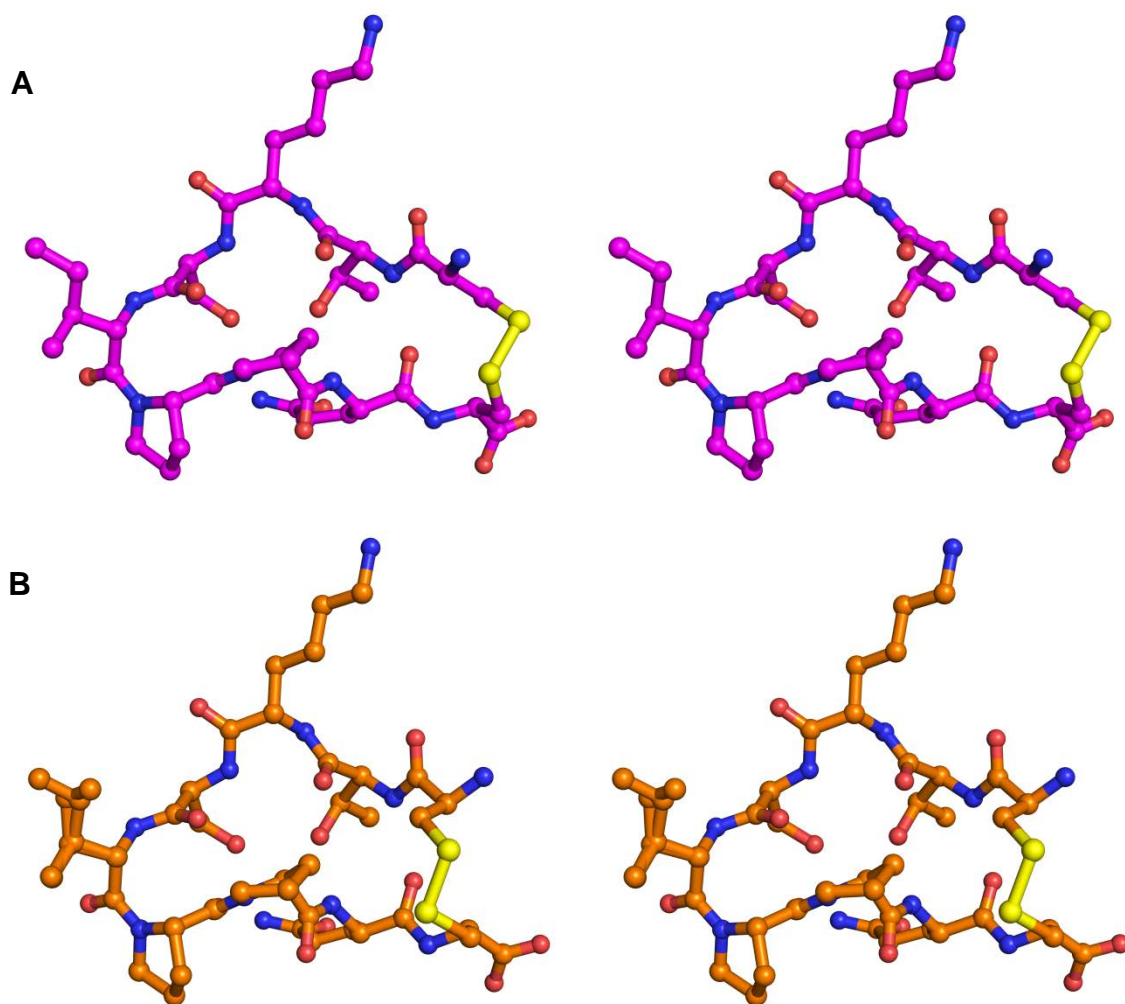
**Figura 26.** Modelo tridimensional do complexo ptry9\_5 e tripsina no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . **A)** Modelo do complexo entre ptry9 (laranja) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo está representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptry9\_5 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.

**Tabela 6.** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do Ptryp9\_3 e Ptryp9\_5. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

Conjunto	Ptryp9_3	Ptryp9_5
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> <sub>3</sub> 21	<i>P</i> <sub>2</sub> 12 <sub>1</sub>
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,24	1,20
<b>Limite de Resolução (Å)</b>	23,25 - 1,61 (1,67 - 1,61)	29,92- 1,15 (1,19- 1,15)
<b>Célula Unitária (a, b, c) (Å)</b>	68,69, 68,69, 74,57	59,83, 61,56, 67,03
<b>Total de reflexões</b>	121757 (10811)	1157232 (34125)
<b>Reflexões únicas</b>	26036 (2423)	83027 (6078)
<b>Multiplicidade</b>	4,7 (4,4)	13,9 (5,6)
<b>Completeza (%)</b>	97,39 (92,65)	93,78 (69,34)
<b>Média I/σ (I)</b>	12,78 (1,39)	29,60 (1,12)
<b>Wilson B-factor</b>	20,88	11,68
<i>R</i> <sub>merge</sub>	0,070 (0,727)	0,051 (1,296)
<i>R</i> <sub>meas</sub>	0,079 (0,822)	0,052 (1,415)
<i>R</i> <sub>pim</sub>	0,035 (0,376)	0,012 (0,550)
<b>CC1/2</b>	0,998 (0,674)	1 (0,582)
<b>CC*</b>	0,999 (0,897)	1 (0,858)
<b>Reflexões usadas no refinamento</b>	26035 (2422)	83128 (6073)
<b>Reflexões usadas para o <i>R</i><sub>free</sub></b>	1984 (182)	2002 (136)
<i>R</i> <sub>work</sub>	0,156 (0,303)	0,145 (0,398)
<i>R</i> <sub>free</sub>	0,188 (0,354)	0,156 (0,421)
<b>CC<sub>(work)</sub></b>	0,464 (0,087)	0,973 (0,701)
<b>CC<sub>(free)</sub></b>	0,998 (0892)	0,977 (0,705)
<b>Número de átomos excluindo hidrogênio</b>	1966	2203
<b>macromoléculas</b>	1727	1773
<b>ligantes</b>	6	61
<b>solvente</b>	233	369
<b>Resíduos de proteína</b>	232	232
<b>RMS (bonds)</b>	0,009	0,024
<b>RMS (angles)</b>	1,24	1,45
<b>Ramachandran <i>favored</i> (%)</b>	99,12	97,80
<b>Ramachandran <i>allowed</i> (%)</b>	0,88	2,20
<b>Ramachandran <i>outliers</i> (%)</b>	0,00	0,00
<b>Rôtameros outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Clash score</b>	0,29	4,16
<b>Média B-factor</b>	26,18	17,96
<b>macromoléculas</b>	24,67	14,82
<b>ligantes</b>	81,18	42,01
<b>solventes</b>	35,93	29,07
<b>Número de grupos TLS</b>	11	5
<b>Código PDB</b>	6E5M	6EAT

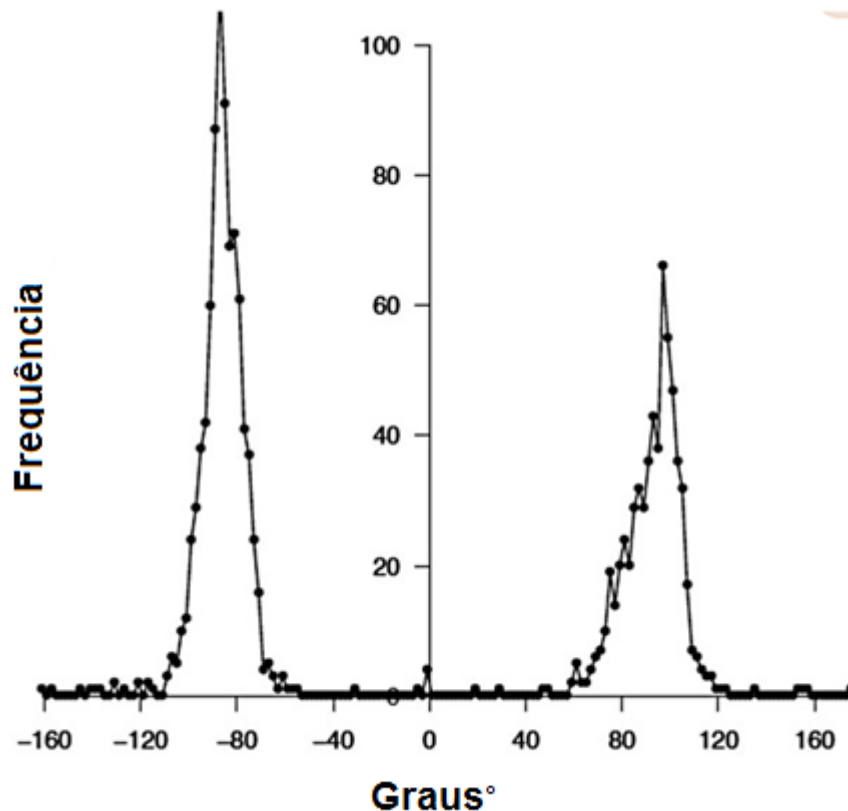
Uma análise estrutural dos dois peptídeos pode se notar que a Cys<sup>1</sup> do conjunto ptryp9\_3 apresentava a conformação de D-aminoácido (C<sub>D</sub>). A análise estrutural do peptídeo do conjunto ptryp9\_5 apresenta todos os resíduos na sua forma L (Figura 27). Com a exceção da C<sub>D</sub><sup>1</sup> todas as cadeias laterais das estruturas cristalográficas adotam o mesmo rôtamero. Para o fácil entendimento e diferenciação das duas estruturas a partir de agora o conjunto ptryp9\_3 que apresenta C<sub>D</sub><sup>1</sup> na sua estrutura será denominado de ptryp9-D, e o conjunto ptryp9\_5 em que todos os aminoácidos estão em sua conformação L será denominado de ptryp9-L.

Ao longo do peptídeo ptryp9-L (CTKSIPPQC) e o ptryp9-D (C<sub>D</sub>TKSIPPQC) pode se notar que a densidade eletrônica envolve totalmente os peptídeos mostrando claramente a posição dos átomos. A densidade eletrônica mostrou a presença da ligação de dissulfeto ao redor dos átomos de enxofre responsáveis pela ciclização do peptídeo e a presença de uma conformação dupla do aminoácido P1'-Ile<sup>5</sup> na estrutura do conjunto ptryp9-L (Figura 27).



**Figura 27.** *Stereo View (crossed eye)* dos peptídeos ptry9-D (**A**, magenta) e ptry9-L (**B**, laranja), os átomos estão representados por esferas e as ligações por barras.

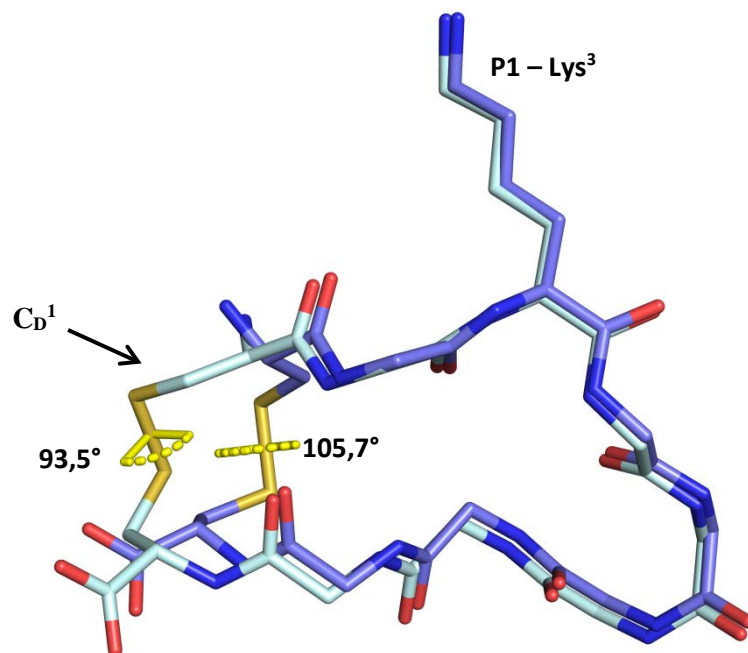
Um software (Disulfide by Design 2.0) desenvolvido por Craig analisou diferentes ligações de dissulfeto de estruturas depositadas no PDB. Os resultados apresentados por Craig demonstram a preferência pela posição dos ângulos torcionais das ligações de dissulfeto ( $S^Y-S^Y$ ) em  $-87^\circ$  e  $+97^\circ$ . O ângulo de torção foi definido pela rotação dos dois átomos do carbono- $\beta$  em torno da ligação  $S^Y-S^Y$  (Figura 26) (Craig DB, *et al.*, 2013).



**Figura 28.** Distribuição dos ângulos de torção da ligação S $\gamma$ -S $\gamma$  observados em 1505 pontes dissulfeto em 331 estruturas de proteínas depositadas no PDB. Picos ocorrem em -87 e +97 graus (Retirado e adaptado de Craig DB, *et al.*,2013).

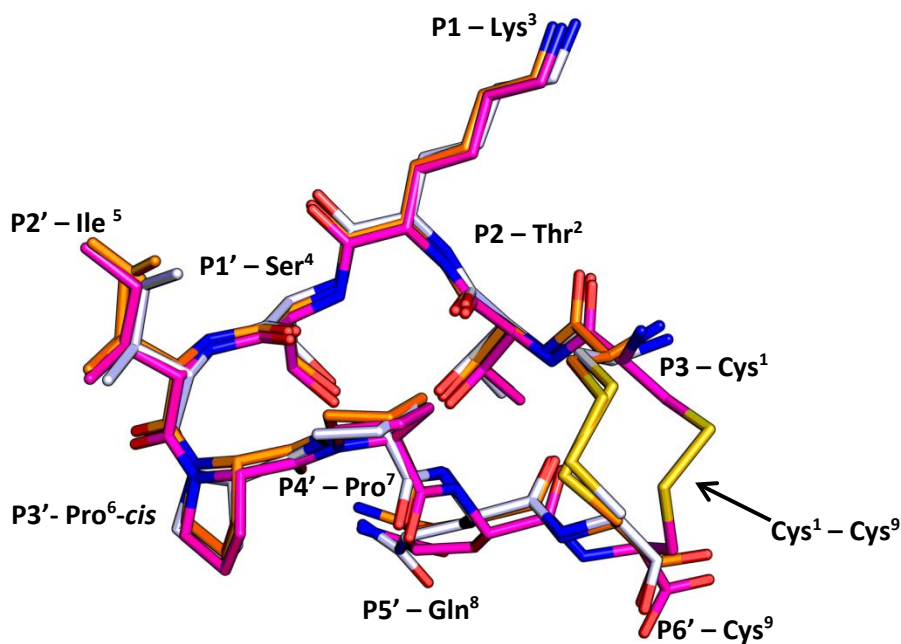
O ângulo torcional da ligação de dissulfeto do peptídeo ptryp9-D é de 93,5°, ptryp9-L é de 105,7° e do BTCL é de 104,2°. A presença da C<sub>D</sub><sup>1</sup> na posição P3 faz com que os ângulos de torção da cadeia principal tenham uma alteração na ligação dissulfeto no peptídeo ptryp9-D evidenciado pelos diferentes ângulos entre as estruturas (Figura 29). Utilizando os dados fornecidos por Craig podemos analisar as ligações de dissulfeto das estruturas ptryp9-L e ptryp9-D estão dentro da faixa de outras estruturas depositadas no PBD, demonstrando que a presença da C<sub>D</sub><sup>1</sup> na estrutura não foi capaz de causar uma mudança estrutural fora das regiões mais habituais das ligações de dissulfeto.

A presença da C<sub>D</sub><sup>1</sup> no peptídeo ptryp9-D não muda estruturalmente as posições dos demais resíduos em comparação com o peptídeo ptryp9-L (Figura 29).



**Figura 29.** Sobreposição do ptryp9-D (ciano) e ptryp9-L (azul) mostrando os ângulos torcionais entre as cisteínas (S<sub>y</sub>-S<sub>y</sub>). O ângulo torcional para o peptídeo ptryp9-D é de 93,5° e do peptídeo ptryp9-L é de 105,7°. As cadeis laterais dos resíduos Cys<sup>1</sup>, Cys<sup>9</sup> e Lys<sup>3</sup> estão demonstradas em *sticks*.

Como já introduzido, os *loops* inibitórios derivados dos BBIs apresentam em sua estrutura um resíduo de prolina em configuração *cis* na posição P3' (Brauer, A. *et al.*, 2001) ainda de acordo com Brauer e Song a presença de um resíduo de treonina na posição P2 é ideal para a inibição de tripsina. A presença de uma prolina na configuração *cis* na posição P3' e de uma treonina na posição P2 foi observada nas estruturas nos dois peptídeos ptryp9-D e ptryp9-L como também está presente na estrutura do BTCl (Barbosa, *et al.*, 2007) (Figura 30).

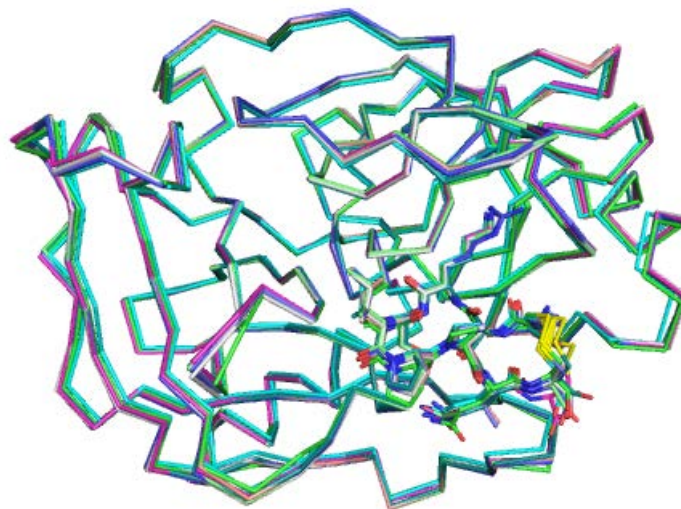


**Figura 30.** Sobreposição do ptryp9-D (magenta), ptryp9-L (laranja) e BTC1 (branco). A ligação de dissulfeto entre as cisteínas (Cys<sup>1</sup> - Cys<sup>9</sup>) esta destacada em amarelo.

Uma sobreposição dos complexos dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outras estruturas resolvidas por cristalografia de raios X de peptídeos derivados em complexo com tripsina demonstrou que os peptídeos se assemelham estruturalmente se ligando no sítio ativo da tripsina (Figura 31.A). Além de se posicionarem no sítio ativo da enzima os peptídeos ptryp9-D e ptryp9-L também apresentam a mesma conformação estrutural dos demais peptídeos derivados de BBI naturais. Uma sobreposição dos peptídeos resolvidos em solução por RMN também demonstrou a mesma semelhança estrutural, sendo que a maior diferença observada dos peptídeos sintéticos derivados de outras fontes naturais em comparação aos peptídeos ptryp9-D é a ligação de dissulfeto que está posicionada estruturalmente em outra conformação como já foi descrito na comparação entre os ptryp9-L e ptryp9-D (Figura 31.B).



**A**



**B**



**Figura 31.** Sobreposição de peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos derivados de BBIs. **A)** sobreposição dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvidos por cristalografia de raios X. **B)** superposição dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com outros peptídeos sintéticos derivados de BBIs naturais resolvidos por RMN.

O valor de RMSD (*root mean square deviation*) é a medida da distância média entre os átomos da cadeia principal das proteínas sobrepostas. O RMSD dos peptídeos foi calculado (Tabela 7). Foi demonstrado que os peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D são estruturalmente muito similares. A comparação dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D com o BTCl demonstrou uma diferença devido à presença do



resíduo C<sub>D</sub><sup>1</sup> no ptryp9-D, devendo-se considerar que o número de átomos usados na sobreposição serem diferentes.

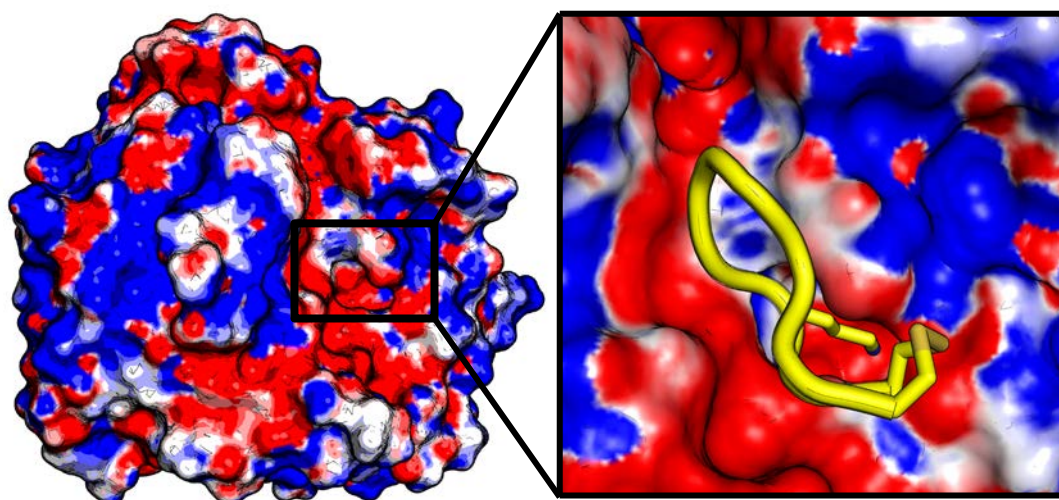
**Tabela 7.** RMSD das sobreposições dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D e BTCI. N\* representa o número de C<sub>α</sub> usados no cálculo do RMSD.

	ptryp9-L	BTCI	BTCI
ptryp9-L	-	0,295	-
ptryp9-D	0,161	-	0,538
N*	7	8	9

A estrutura do peptídeo ptryp9-L entre tripsina foi depositada no PDB com o código 6EAT e a estrutura do peptídeo ptryp9-D em complexo com a tripsina depositada no PDB com o código 6E5M.

### 5.2.3 Análise da interface do complexo ptryp9 e a tripsina

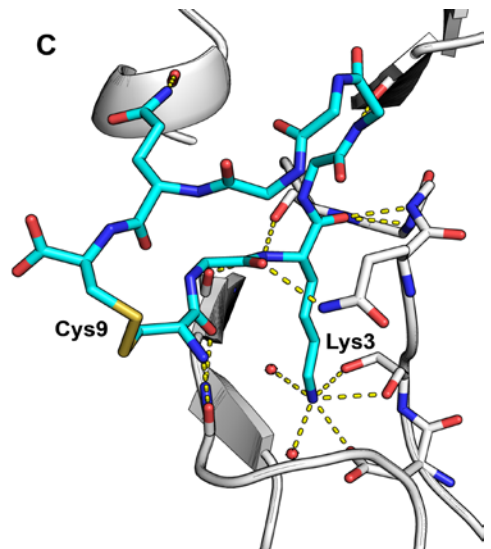
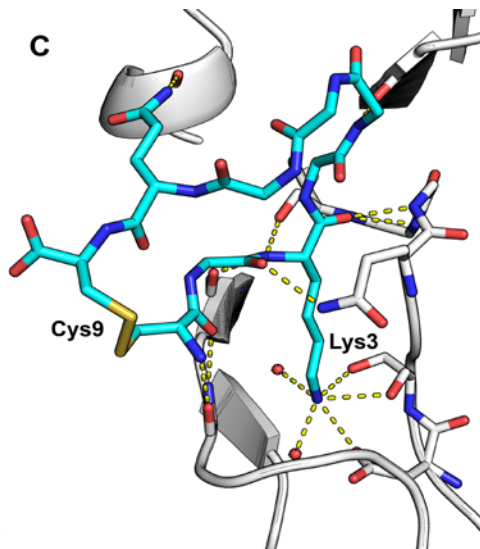
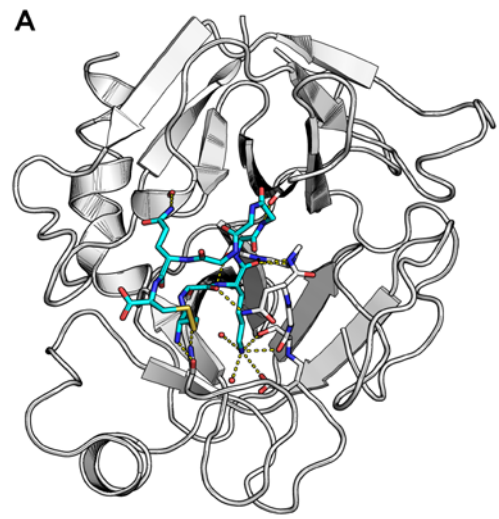
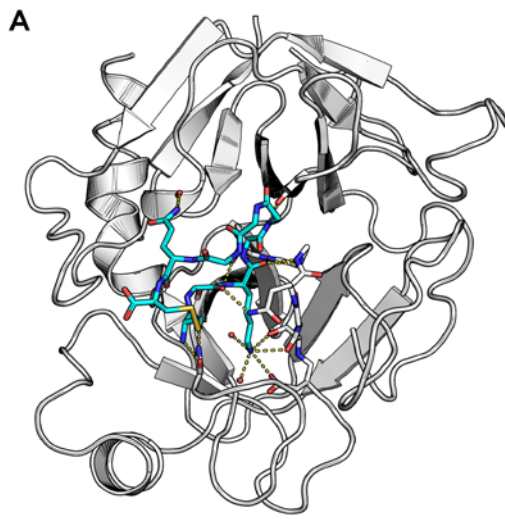
O potencial eletrostático é codificado pelas cores dos resíduos presentes na superfície (Nicholls A, *et al*, 1991). A cadeia lateral prolongada carregada positivamente (azul) de Lys3 tem complementaridade eletrostática com a cadeia lateral de carregada negativamente (vermelha) pela presença do resíduo Asp<sup>189</sup> no bolsão de especificidade S1 da tripsina (Figura 32).



**Figura 32.** Superfície eletrostática do ptryp9 ligado a tripsina calculada de -5 kT/e a +5 kT/e. O gradiente positivo está representado em azul e o gradiente negativo em

vermelho. **A)** Bolsão S1 da tripsina destacado em vermelho. **B)** Zoom do bolsão S1 com o ptryp9 ligado, a ponte de dissulfeto esta demonstrada em bastões.

A cadeia lateral do resíduo P1-Lys<sup>3</sup> dos peptídeos ptryp9-D e ptryp9-L interagem no bolsão S1 da tripsina, interagindo com a cadeia lateral do resíduo Asp<sup>189</sup>, com a cadeia principal da Ser<sup>190</sup> e duas moléculas de água (Figura 30). As estruturas dos peptídeos ptryp9-D e -L em complexo com a tripsina apresentam duas moléculas de água enterradas e uma molécula de Ca<sup>2+</sup>, como foi observado no complexo BTCl e tripsina (Barbosa *et. al.*, 2007).



**Figura 33.** *Stereo view (cross-eye)* do complexo entre ptryp9 e tripsina. **A)** *Stereo view* do ptryp9-L (ciano) em complexo com tripsina (cinza). **B)** *Stereo view* dos contatos intermoleculares do ptryp9-L em complexo com a tripsina. Os contatos estão destacados de amarelo. Lys<sup>3</sup> e Cys<sup>9</sup> estão destacadas. **C)** *Stereo view* dos contatos intermoleculares do ptryp9-D em complexo com a tripsina. Os contatos estão destacados de amarelo. Lys<sup>3</sup> e Cys<sup>9</sup> estão destacadas.

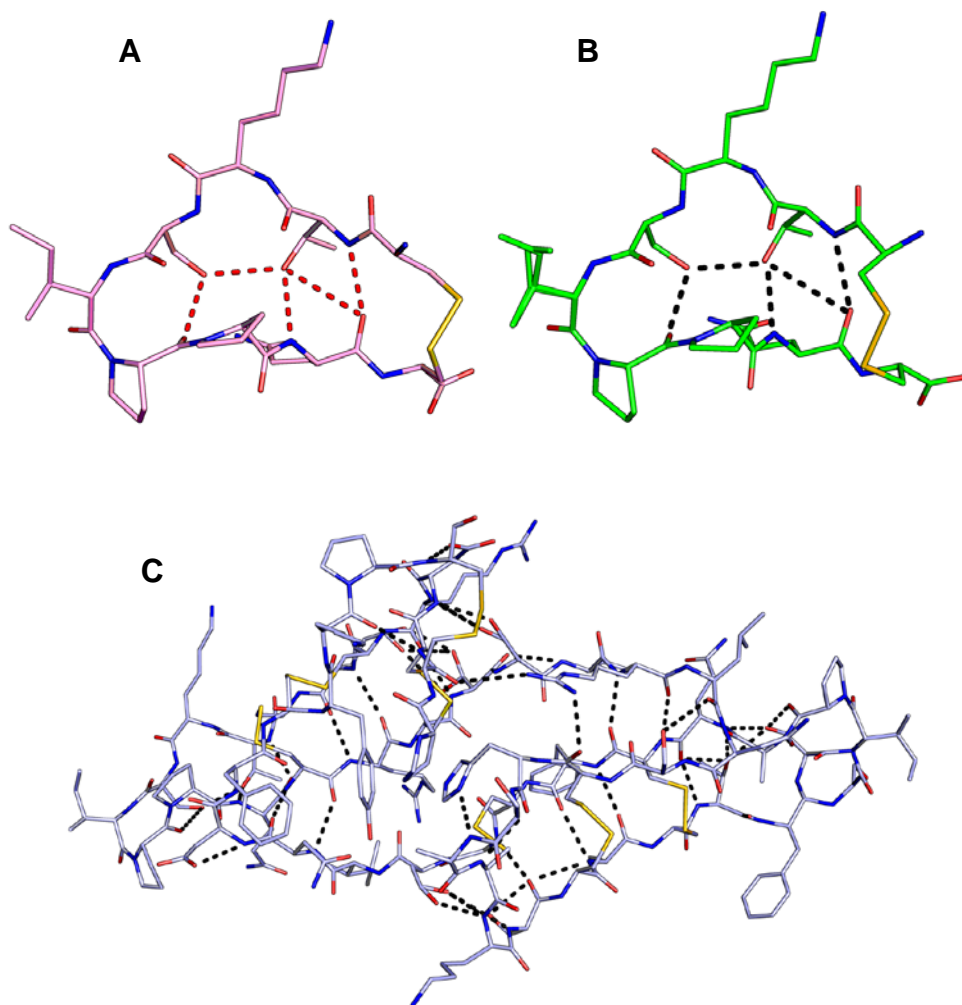
As interações da interface entre os peptídeos e a enzima foram mapeadas e demonstradas (Tabela 8). Inicialmente pode se notar que os contatos são altamente semelhantes entre peptídeos ptryp9-D, ptryp9-L e o BTCI. Esses contatos altamente conservados nos sugerem que o peptídeo está localizado estruturalmente na mesma posição do inibidor original. Também pode se observar que os contatos polares são mantidos independentemente do grupo cristalino e da configuração D ou L da Cys<sup>1</sup>. O alto número de contatos entre o BTCI e a tripsina deve-se à sua maior quantidade de resíduos devido à interface mais extensa em comparação aos peptídeos ptryp9.

O resíduo de maior interação com a tripsina é o resíduo de Lys<sup>3</sup>. O nitrogênio<sup>7</sup> da cadeia lateral da Lys<sup>3</sup> é o resíduo responsável por interagir diretamente no sítio S1 fazendo uma ponte salina com o átomo de oxigênio<sup>δ1</sup> da cadeia lateral do resíduo Asp<sup>189</sup> que confere especificidade para os resíduos carregados positivamente devido a sua carga negativa. Os átomos de nitrogênio da cadeia principal dos resíduos Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> interagem diretamente com o átomo oxigênio<sup>γ</sup> cadeia lateral do resíduo da Ser<sup>195</sup> da tripsina com uma distância de 2,8 Å, demonstrando uma forte interação com o resíduo catalítico da tripsina e conseqüentemente importante para a inibição da tripsina. Além dos contatos polares entre Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> são demonstrados os contatos adjacentes que estabilizam o inibidor no sítio ativo da tripsina (Tabela 8). De acordo com McBride, a presença de Thr<sup>2</sup> é o resíduo ideal na posição P2 para a inibição de tripsina (McBride, J. D. *et al*, 2002). Isso pode ser evidenciado nos dados aqui mostrados, devido aos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D apresentarem um contato polar ausente no BTCI. O átomo de nitrogênio<sup>ε2</sup> da cadeia lateral do resíduo Gln<sup>31</sup> do BTCI faz uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da cadeia principal da His<sup>57</sup>, porém com uma distância de 3,7 Å, essa interação está presente no ptryp9-D mostrando que o arranjo estrutural da C<sub>D</sub><sup>1</sup> ligado com Cys<sup>9</sup> forçou o resíduo Gln<sup>8</sup> a uma aproximação estrutural da tripsina que não está presente nas outras estruturas.

**Tabela 8.** Contatos polares de até 3,2 Å do ptryp9-D, ptryp9-L e BTCI. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCI.

Ptryp9-D	Dis*	Tripsina	Ptryp9-L	Dis*	Tripsina	BTCI	Dis*	Trispina
						Cys22 - O	2,8	Ser217 - OG
C <sub>D</sub> 1 - O	3,2	Gly216 - N	Cys1 - O	3,1	Gly216 - N	Cys24 - O	3,1	Gly216 - N
C <sub>D</sub> 1 - N	2,8	Gly216 - O	Cys1 - N	2,7	Gly216 - O	Cys24 - N	2,9	Gly216 - O
Thr2 - O	2,9	Gln192 - NE2	Thr2 - O	2,8	Gln192 - NE2			
Lys3 - N	3,2	Ser214 - O	Lys3 - N	3,0	Ser214 - O	Lys26 - N	3,1	Ser214 - O
Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys26 - N	2,8	Ser195 - OG
Lys3 - NZ	3,0	Ser190 - OG	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - OG	Lys26 - NZ	3,0	Ser190 - OG
Lys3 - NZ	3,1	Ser190 - O	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - O	Lys26 - NZ	2,9	Ser190 - O
Lys3 - NZ	3,1	Asp189 - OD1	Lys3 - NZ	3,0	Asp189 - OD1	Lys26 - NZ	3,1	Asp189 - OD1
Lys3 - O	2,8	Ser195 - N	Lys3 - O	2,7	Ser195 - N	Lys26 - O	2,8	Ser195 - N
Lys3 - O	3,2	Asp194 - N	Lys3 - O	3,2	Asp194 - N	Lys26 - O	3,3	Asp194 - N
Lys3 - O	2,7	Gly193 - N	Lys3 - O	2,6	Gly193 - N	Lys26 - O	2,7	Gly193 - N
Ser4 - N	3,0	Ser195 - OG	Ser4 - N	2,9	Ser195 - OG	Ser27 - N	3,0	Ser195 - OG
Ile5 - N	3,1	Phe41 - O	Ile5 - N	3,0	Phe41 - O	Ile28 - N	3,0	Phe41 - O
			Gln8 - NE2	2,7	His57 - O			
						Ile28 - O	2,8	Lys60 - N <sup>B</sup>
						Arg33 - NH2	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH1	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH2	3,2	Asn97 - O

Pelo mapeamento dos contatos do ptryp9-L e ptryp9-D pode se notar que o BTCI faz mais contatos intermoleculares que os peptídeos derivados do seu *loop* inibitório devido a sua maior sequência (Figura 34). Os contatos presentes no BTCI e ausentes nos peptídeos justificam o maior potencial inibitório devido a presença de estruturas secundárias do BTCI e ausentes nos peptídeos.



**Figura 34.** Contatos intermoleculares dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D e BTCI. **A)** contatos intramoleculares do ptryp9-D (rosa) destacados em vermelho. **B)** Contatos intramoleculares do ptryp9-L (verde) destacados em preto. **C)** Contatos intramoleculares do BTCI (azul-claro) destacados em preto.

Maeder demonstrou resultados que apoiam essa hipótese. Maeder demonstrou que a presença de resíduos fora da região delimitada pela ligação de dissulfeto (Cys<sup>1</sup> – Cys<sup>9</sup>) que configuram os *loops* inibitórios dos BBIs conferem uma maior atividade inibitória e estabilidade a essas estruturas (Maeder, D. L. et al, 1992). Portanto de acordo com os ensaios de atividade foi demonstrado que a inibição da tripsina pelo ptryp9 é menos potente que o BTCI devido ao quantitativo de interações com a tripsina serem menores e a ausência das interações secundárias.

## 5.2.4 Área acessível ao solvente

Foi feita uma análise da área acessível ao solvente (ASA) e dos resíduos que estão presentes na interface dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D (Lee, B. e Richards, F.M., 1971) (Tabela 9). Os locais de ligação específica da tripsina, juntamente com o ambiente reativo dos inibidores, indicam como a afinidade de ligação e o reconhecimento molecular afetando a atividade do sistema (Scheidig *et al.*, 1997).

**Tabela 9.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D, peptídeo do BTCl.

	Área acessível total	Área acessível enterrada	Porcentagem enterrada	Nº de resíduos na superfície	Nº de resíduos na interface
<b>ptryp9-L</b>	1024,4	572,2	55,9%	9	8
<b>ptryp9-D</b>	1070,3	580,9	54,3%	9	9
<b>Pep-BTCl</b>	1031,9	521,2	50,5%	9	8

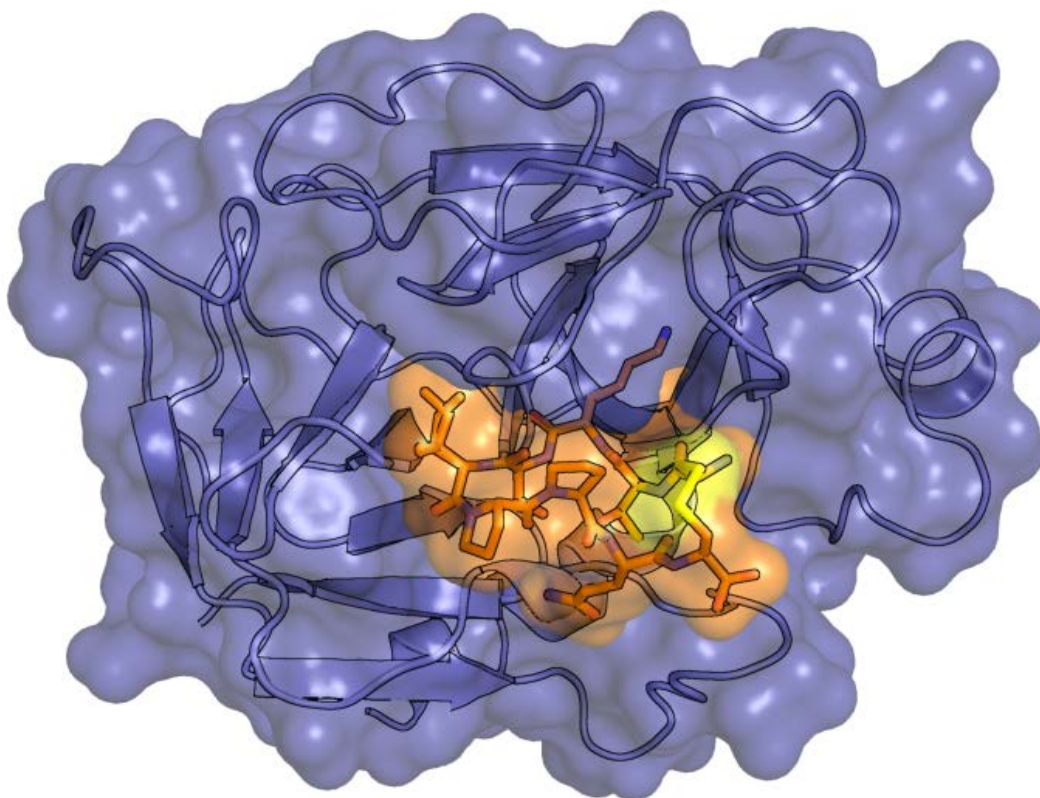
Para a análise da ASA foi isolado apenas os resíduos do *loop* reativo que interage com a tripsina do BTCl para métodos de comparação. Os peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D e o pep-BTCl apresentam um valor aproximado de 50% de ASA enterrada na tripsina. A diferença das estruturas é notada pela presença da C<sub>D</sub><sup>1</sup> fazendo com que os 9 resíduos permaneçam na superfície da estrutura do peptídeo ptryp9-D. A estrutura toda do BTCl demonstrou que 56 resíduos dos 83 de sua sequência se encontram na superfície da estrutura e 15 resíduos estão na interface com a tripsina, sugerindo que a maior superfície do BTCl faz com que tenha maiores interações com a tripsina e uma maior estabilidade estrutural em comparação com os peptídeos derivados.

Todos os resíduos foram mapeados e demonstrados as suas ASAs individuais (Tabela 10). A análise individual dos resíduos demonstrou que os resíduos Thr<sup>2</sup>, Lys<sup>3</sup>, Ser<sup>4</sup> apresentam um valor de aproximadamente 100% para a área enterrada (AE). Esse valor demonstra a afinidade do resíduo de Lys<sup>3</sup> pelo bolsão S1 da tripsina, fazendo com que os resíduos adjacentes sejam totalmente enterrados no bolsão da tripsina (Figura 35).

**Tabela 10.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp9-L, ptryp9-D e BTCI.

Ptryp9-L				Ptryp9-D				BTCI			
Resíduo	ASA	AE	AE%	Resíduo	ASA	AE	AE%	Resíduo	ASA	AE	AE%
CYS1	109,52	58,22	53,16	DCY1	112,73	61,95	53,16	ARG21	165,73	39,2	23,65
THR2	64,11	63,61	99,22	THR2	65,61	63,64	99,22	CYS22	38,26	23,29	60,87
LYS3	202,04	202,04	100	LYS3	206,73	205,79	100	GLU23	91,34	67,04	73,40
SER4	43,51	40,34	92,71	SER4	47,96	43,94	92,71	CYS24	52,19	41,27	79,08
ILE5	175,45	137,63	78,44	ILE5	178,41	139,63	78,44	THR25	67,88	49,1	72,33
PRO6	98,39	6,87	6,68	PRO6	102,62	6,87	6,68	LYS26	208,35	207,92	99,79
PRO7	75,06	16,58	22,09	PRO7	94,70	19,17	22,09	SER27	49,37	45,55	92,26
GLN8	117,44	46,90	39,94	GLN8	116,79	38,45	39,94	ILE28	165,95	126,82	76,42
CYS9	138,87	0,00	0	CYS9	152,36	10,27	0	PRO29	86,41	15,74	18,22
								PRO30	48,58	14,15	29,13
								GLN31	89,76	21,44	23,89
								ARG33	123,23	61,54	49,94
								SER35	42,8	15,14	35,37
								ILE64	99,19	10,2	10,28
								CYS68	58,6	1,32	2,25





**Figura 35.** Área acessível ao solvente do peptídeo ptryp9 em complexo com a tripsina. A superfície da tripsina em azul escuro e a superfície do ptryp9 em laranja. A tripsina esta demonstrada em *cartoon* e o peptídeo destacado em bastões. As cisteínas estão destacadas.

### 5.2.5 Fatores de temperatura do peptídeo ptryp9

De acordo com Robert Campbell o fator de temperatura (valor de temperatura, fator B, ou fator Debye-Waller) é um fator que pode ser aplicado ao termo de espalhamento de raios X para cada átomo (ou para grupos de átomos). O fator de temperatura descreve o grau em que a densidade de elétrons é distribuída, refletindo as incertezas nas posições dos átomos (Rhodes, G. 2006). Os fatores de temperatura de uma estrutura cristalográfica indicam a mobilidade de um átomo e também podem indicar regiões desordenadas na estrutura ou onde existem possíveis erros na construção do modelo (T.L. Blundell e L.N. Johnson 1976). Esses erros podem ser devido a uma região desordenada onde a proteína não esta bem estruturada ou erros manuais no refinamento.

De acordo com Pavel os fatores de temperatura estão relacionados com a resolução atômica da estrutura (Pavel Afonine, 2003). Um alto valor do fator de temperatura reflete uma baixa densidade eletrônica. Geralmente, um valor de temperatura menor que  $30 \text{ \AA}^2$  significam confiança na posição dos átomos, enquanto um valor de temperatura maior que  $60 \text{ \AA}^2$  significam uma desordem ou uma região modelada de forma errônea (Morris, AL. *Et al*, 1992).

Os fatores de temperatura dos peptídeos ptryp9-L e ptryp9-D foram calculados e mostrados nas tabelas 11 e 12. Inicialmente o modelo do ptryp9-D foi modelado como L-Cys<sup>1</sup>, devido aos altos valores para o fator de temperatura foi notado que o modelo estava sendo modelado de forma errônea (Tabela 10). De acordo com Pavel estruturas como a do ptryp9-L apresentam um valor de fator de temperatura individual de  $17,20 \text{ \AA}^2$  e média de  $21,76 \text{ \AA}^2$  (Pavel Afonine, 2003). O átomo de nitrogênio da Cys<sup>1</sup> do ptryp9-D inicialmente foi modelado em sua conformação L apresentando um valor de  $121,79 \text{ \AA}^2$  mostrando um erro no refinamento. Quando o nitrogênio do ptryp9-D passou a ser modelada como C<sub>D</sub><sup>1</sup> foi observado um decréscimo no fator de temperatura (Tabela 10). A média de todos os fatores de temperatura do ptryp9-L é de  $28,85 \text{ \AA}^2$ . Os altos valores dos fatores de estrutura dos resíduos Gln<sup>8</sup> e Cys<sup>9</sup> são explicados devido a pouca interação que esses resíduos apresentaram com a tripsina proporcionando um movimento maior dos átomos.

Como descrito na ASA, os dois peptídeos apresentaram o menor fator de temperatura para os resíduos de Thr<sup>2</sup>, Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> devido a sua forte interação com a tripsina e conseqüentemente sua menor mobilidade estrutural. De acordo com Pavel estruturas com a resolução do ptryp9-L apresentam um fator de temperatura na faixa individual de  $10,58 \text{ \AA}^2$  e  $16,44 \text{ \AA}^2$  para a média (Pavel Afonine,2003). Como demonstrado a média dos fatores de temperatura do ptryp9-L está dentro dos valores sugeridos por Pavel.

**Tabela 11.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp9-D. Estão demonstradas as cisteína D e L.

Resíduo	Cys <sup>1*</sup>	C <sub>D</sub> <sup>1</sup>	Thr <sup>2</sup>	Lys <sup>3</sup>	Ser <sup>4</sup>	Ile <sup>5</sup>	cis-Pro <sup>6</sup>	Pro <sup>7</sup>	Gln <sup>8</sup>	Cys <sup>9</sup>	
<b>Átomo / fatores de temperatura individuais</b>	O - 25,05	O - 26,49	O - 21,23	O - 20,47 N - 19,28	O - 24,71	O - 27,67 N - 21,98	O - 28,31	O - 30,93	O - 28,23 N - 27,59	O - 30,77	
	N - 121,19	N - 34,24	N - 23,25	CA - 22,18	N - 20,78	C - 26,01	N - 28,48	N - 26,66	CA - 30,28	N - 34,00	
	CA - 57,79	CA - 29,55	CA - 21,00	C - 23,07	CA - 20,79	CA - 24,06	CA - 28,01	CA - 25,89	C - 30,58	CA - 35,19	
	C - 29,38	C - 25,67	C - 20,02	CB - 17,42	C - 21,05	CB - 24,99	C - 26,54	C - 28,19	CB - 32,49	C - 43,51	
	CB - 40,16	CB - 28,85	CB - 23,27	CG - 21,77	CB - 25,19	CG1 - 27,70	CB - 31,49	CB - 27,11	CG - 47,33	CB - 43,07	
	SG - 28,42	SG - 36,02	OG1 - 22,57 CG2 - 23,18	CD - 20,41 CE - 20,58 NZ - 24,92	OG - 24,31	CG2 - 27,21 CD1 - 34,69	CG - 32,53 CD - 32,46	CG - 33,42 CD - 28,56	CD - 51,07 OE1 - 37,54 NE2 - 60,21	SG - 39,57 OXT - 53,67	
<b><math>\bar{X}</math> Fator de temperatura</b>	<b>50,33</b>	<b>30,14</b>	<b>22,07</b>	<b>21,12</b>	<b>22,81</b>	<b>26,79</b>	<b>29,69</b>	<b>28,68</b>	<b>38,37</b>	<b>39,97</b>	<b><math>\bar{X} = 28,85</math></b>
<b>Ocupância</b>	<b>1</b>	<b>0,87</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,88</b>	

$\bar{X}$  = Média

**Tabela 12.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp9-L.

Resíduo	Cys <sup>1</sup>	Thr <sup>2</sup>	Lys <sup>3</sup>	Ser <sup>4</sup>	Ile <sup>5A</sup>	Ile <sup>5B</sup>	cis-Pro <sup>6</sup>	Pro <sup>7</sup>	Gln <sup>8</sup>	Cys <sup>9</sup>	
<b>Átomo / fatores de temperatura individuais</b>	O - 15,37	O - 13,78	O - 11,79	O - 13,41	O - 20,63*	O - 20,63*	O - 14,90	O - 17,64	O - 16,49	O - 30,77	
	N - 20,22	N - 14,03	N - 11,80	N - 12,43	N - 14,64*	N - 14,64*	N - 17,23	N - 15,99	N - 15,22	N - 20,20	
	CA - 18,57	CA - 13,38	CA - 11,15	CA - 13,12	C - 18,75*	C - 18,75*	CA - 16,92	CA - 15,20	CA - 15,42	CA - 21,52	
	C - 15,47	C - 14,20	C - 11,46	C - 13,72	CA - 14,55	CA - 15,13	C - 16,44	C - 16,69	C - 18,59	C - 26,14	
	CB - 23,31	CB - 12,16	CB - 12,75	CB - 13,40	CB - 18,26	CB - 18,04	CB - 20,21	CB - 17,69	CB - 15,51	CB - 21,98	
	SG - 23,08	OG1 - 13,62 CG2 - 14,45	CG - 15,19 CD - 13,70 CE - 16,73 NZ - 16,98	OG - 13,66	CG1 - 17,11 CG2 - 18,53 CD1 - 22,30	CG1 - 15,69 CG2 - 21,18 CD1 - 15,75	CG - 24,52 CD - 20,32	CG - 19,54 CD - 19,96	CG - 16,81 CD - 16,80 OE1 - 19,42 NE2 - 16,02	SG - 25,74 OXT - 29,76	
<b><math>\bar{X}</math> Fator de temperatura</b>	<b>19,34</b>	<b>13,66</b>	<b>13,51</b>	<b>13,29</b>	<b>18,1</b>	<b>17,48</b>	<b>18,65</b>	<b>17,53</b>	<b>16,7</b>	<b>25,16</b>	<b><math>\bar{X} = 17,34</math></b>
<b>Ocupância</b>	<b>0,87</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,67</b>	<b>0,33</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,88</b>	

$\bar{X}$  = Média

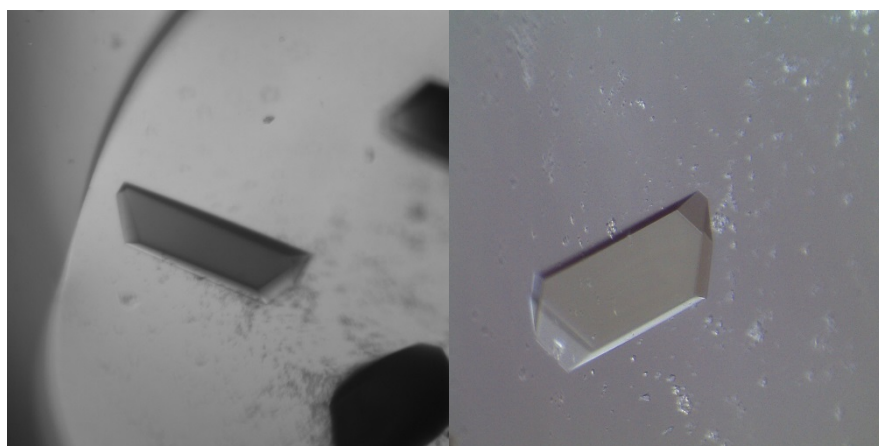
## 5.3 Complexo ptryp8 e tripsina

### 5.3.1 Cristalização do complexo e coleta de dados

Com o objetivo de reproduzir os cristais obtidos entre o complexo do peptídeo ptryp9 e a tripsina foram repetidos os ensaios de cristalização entre o peptídeo ptryp8 e a tripsina. Com os de ensaios de cristalização foram obtidas 6 condições promissoras para o crescimento dos cristais (Tabela 13).

**Tabela 13.** Condições de cristalização do complexo ptryp8 com tripsina e quantidade de crioprotetor

Conjunto	Condição de cristalização	Crioproteção
Ptryp8_1	Sulfato de amônio 0,2 M; MES monohidrato 0,1M pH 6,5; 30 % w/v Polietilenoglicol monometil éter 5000	10% de glicerol
Ptryp8_2	TRIS hidrocloreto 0,1 M pH 8,5; 30% w/v Polietilenoglicol 4000	15% de glicerol
Ptryp8_3	Sulfato de lítio monohidratado 0,2 M; TRIS hidrocloreto 0,1 M pH 8,5; 30 % w/v Polietilenoglicol 4000	5% de PEG400
Ptryp8_4	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sódio tetrahidratado 0,1 M pH 6,5; 30 % w/v Polietilenoglicol 8000	15% de glicerol
Ptryp8_5	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
Ptryp8_6	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 2 M	



**Figura 36.** Imagens dos cristais do complexo entre ptryp8 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M, HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

As condições de cristalização foram refinadas e obtidos monocristais do complexo entre o ptryp8 e a tripsina (Figura 36). Os cristais entre o complexo ptryp8 e tripsina foram levados ao LNLS e submetidos ao experimento de difração de raios X. Para a coleta de dados foram usados diferentes  $\lambda$ . Na coleta de dados do complexo ptryp8 e tripsina foi usado apenas o detector Pilatus 2M. Ao contrário do complexo entre ptryp9 e tripsina o complexo ptryp8 e tripsina foram cristalizados em apenas um grupo espacial  $P2_12_12_1$  (Tabela 14).

**Tabela 14.** Dados da coleta do complexo Ptryp8 com tripsina.

<b>Conjunto</b>	<b>Comprimento de onda (Å)</b>	<b>Detector</b>	<b>Grupo espacial</b>
Ptryp8_1	1,24	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp8_2	1,24	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp8_3	1,24	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp8_4	1,24	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp8_5	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp8_6	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$

Foram coletados 6 conjuntos de dados do complexo ptryp8 e a tripsina. Durante o processamento de dados e refinamento foi observado que em todos os conjuntos de dados o peptídeo ptryp8 estava presente no sítio ativo da tripsina, devido a isso, foi escolhido o melhor conjunto de dados baseado nas estatísticas do processamento (Tabela 15) para o refinamento e construção do modelo cristalográfico do complexo.

**Tabela 15.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp8 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

Conjunto	Resolução o máxima (Å)	Reflexões Obs - Únicas	Multiplici- dade	Completeza (%)	$I/\sigma$	$R_{meas}$ (%)	CC (1/2)
ptryp8_1	1,81	308412 - 46063 (45963 - 7401)	6,70 (6,21)	99,6 (99,2)	13,50 (3,41)	10,7 (63,7)	99,8 (91,3)
ptryp8_2	1,66	206772 - 61015 (32998 - 9699)	3,39 (3,40)	99,1 (97,4)	14,40 (2,38)	7,1 (63,9)	99,8 (82,9)
ptryp8_3	1,69	192188 - 57308 (29504 - 9157)	3,35 (3,22)	99,5 (98,2)	13,39 (2,14)	7,7 (67,4)	99,8 (80,5)
ptryp8_4	1,53	251297 - 75868 (32531 - 11596)	3,31 (2,81)	96,8 (91,1)	16,34 (1,86)	5,4 (71,2)	99,9 (78,7)
ptryp8_5	1,18	1126737 - 143534 (79122 - 18076)	7,85 (4,38)	90,4 (70,4)	25,34 (2,42)	4,6 (63,5)	100,0 (90,0)
<b>ptryp8_6</b>	1,18	1129116 - 152579 (76774 - 21828)	7,40 (3,52)	97,2 (85,9)	26,32 (2,71)	4,3 (53,0)	100,0 (91,5)

Dentre os 6 conjuntos coletados, dois conjuntos se mostraram melhores que os demais conjuntos processados. Os conjuntos ptryp8\_5 e ptryp8\_6 apresentaram a maior resolução, ambas de 1,18 Å. Mesmo o conjunto ptryp8\_6 ter uma multiplicidade menor que o conjunto ptryp8\_5, foi o conjunto escolhido para o refinamento e construção do modelo, pois as demais estatísticas como completeza,  $I/\sigma$  e o  $R_{meas}$  foram superiores. O conjunto ptryp8\_6 é um conjunto de alta resolução com parâmetros de cela  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  e  $a = 59,82$ ,  $b = 61,57$ ,  $c = 66,96$  Å.

### 5.3.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptrp8 e tripsina

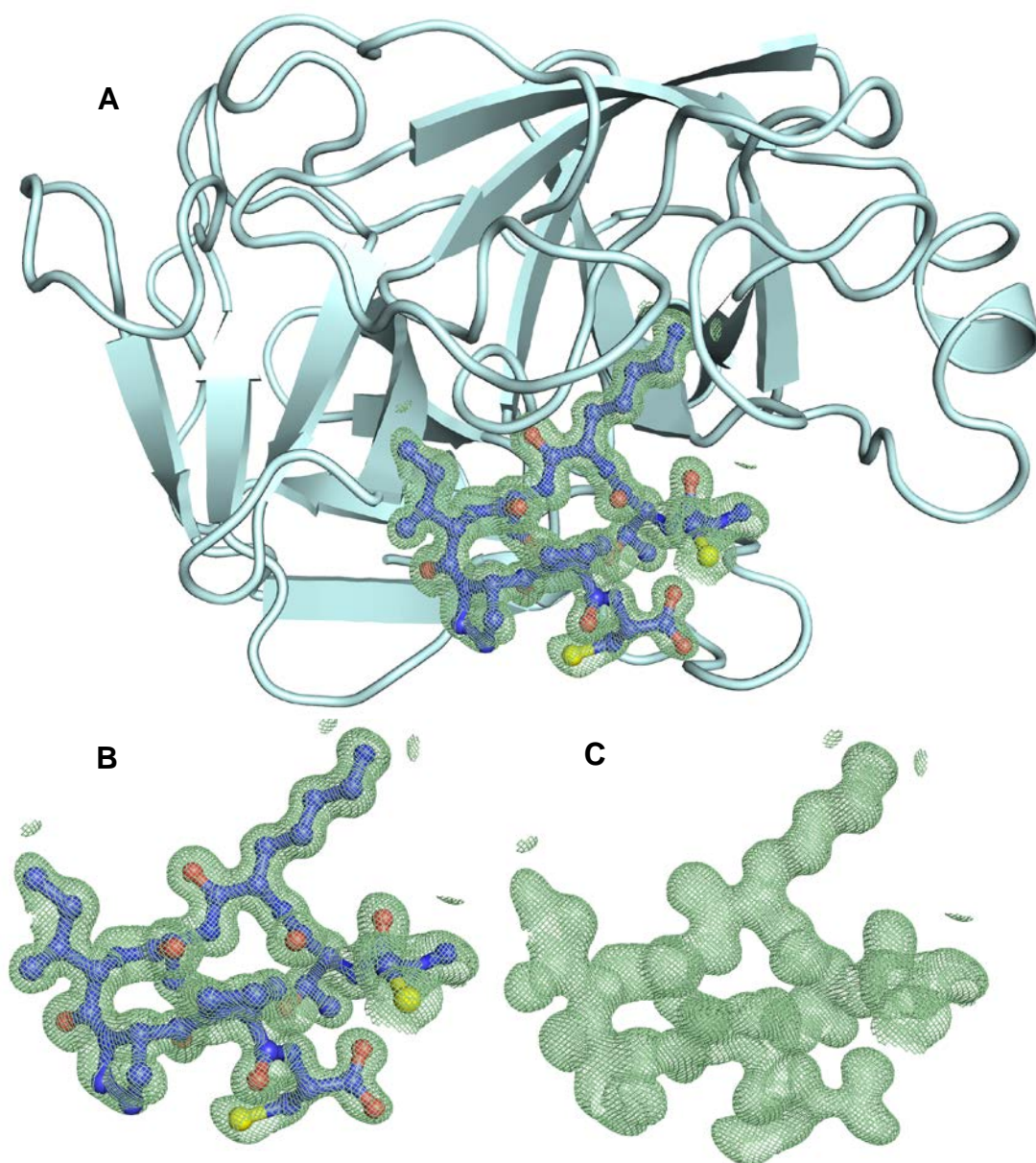
O modelo ptryp8\_6 foi refinado e o modelo tridimensional construído. Foi construído o modelo tridimensional do ptryp8 em complexo com a tripsina e modelado a tripsina na ausência do ptryp8 mostrando apenas a densidade eletrônica do peptídeo (Figura 37).

A densidade eletrônica do ptryp8 mostrou estar envolvendo todos os resíduos da sequência (CTKSIPPC). Os dados cristalográficos do refinamento mostram que um valor de  $R_{free}$  e  $R_{work}$  de 16,2% e 14,4%, abaixo dos 20% descritos por Wlodawer (Wlodawer, A., *et al.*, 2013) (Tabela 15), demonstrando

que a estrutura foi refinada e resolvida. Nenhum resíduo do ptryp8 apresentou na região “desaprovada”, significando que as estruturas modeladas não apresentam um impedimento estérico.

A densidade eletrônica da estrutura mostrou que a ponte de dissulfeto inicialmente desenhada para manter o peptídeo cíclico não pode ser observada na estrutura (Figura 37). Como introduzido foi demonstrado que inibidores sintéticos derivados de BBis naturais que são lineares, ou seja, não apresentam em sua estrutura a ponte de dissulfeto, tem sua atividade inibitória reduzida ou não apresentam atividade inibitória devido a sua instabilidade estrutural (Gariani, T. e Leatherbarrow, R., *et al*, 1997; Zablorna, E. *et al*, 2002; Jaulent, A. M, *et al*, 2001; McBride, J. D., *et al*, 2002; Descours, A. *et al*, 2002; Domingo, G. *et. al.*, 1995). Portanto, de acordo com a estrutura cristalográfica do complexo ptryp8 com a tripsina, sugere que a ausência da ligação de dissulfeto (Cys<sup>1</sup> - Cys<sup>8</sup>), sendo um dos motivos que explicam a redução de a atividade do ptryp8 em comparação ao ptryp9 e BTCl, devido a sua instabilidade estrutural.





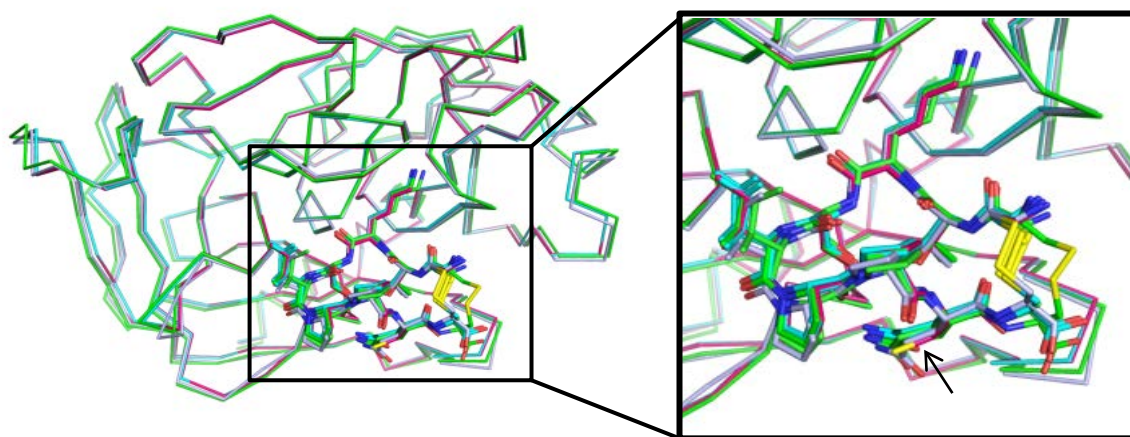
**Figura 37.** Modelo tridimensional do complexo ptryp8 e tripsina no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . **A)** Modelo do complexo entre ptryp8 (azul) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo está representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp8 está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,5$  do peptídeo em verde.



**Tabela 16** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do Ptryp8. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

<b>Conjunto</b>	Ptryp8_6
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,20
<b>Limite de Resolução</b>	27,37 - 1,18 (1,22 - 1,18)
<b>Célula Unitária (a, b, c) (Å)</b>	59,82 61,57 66,96
<b>Total de reflexões</b>	1129339 (43298)
<b>Reflexões únicas</b>	152605 (6997)
<b>Multiplicidade</b>	7,4 (3,4)
<b>Completeza (%)</b>	97,60 (86,64)
<b>Média I/σ (I)</b>	26,32 (2,28)
<b>Wilson B-factor</b>	11,83
<i>R</i> <sub>merge</sub>	0,0409 (0,526)
<i>R</i> <sub>meas</sub>	0,0433 (0,622)
<i>R</i> <sub>pim</sub>	0,0141 (0,325)
<b>CC1/2</b>	1 (0,888)
<b>CC*</b>	1 (0,97)
<b>Reflexões usadas no refinamento</b>	79853 (6992)
<b>Reflexões usadas para o R<sub>free</sub></b>	2008 (180)
<i>R</i> <sub>work</sub>	0,144 (0,244)
<i>R</i> <sub>free</sub>	0,162 (0,255)
<b>CC<sub>(work)</sub></b>	0,975 (0,889)
<b>CC<sub>(free)</sub></b>	0,964 (0,875)
<b>Número de átomos excluindo hidrogênio</b>	2167
<b>macromoléculas</b>	1744
<b>ligantes</b>	36
<b>solvente</b>	387
<b>Resíduos de proteína</b>	231
<b>RMS (bonds)</b>	0,024
<b>RMS (angles)</b>	1,43
<b>Ramachandran <i>favored</i> (%)</b>	98,24
<b>Ramachandran <i>allowed</i> (%)</b>	1,76
<b>Ramachandran <i>outliers</i> (%)</b>	0,00
<b>Rôtameros outliers (%)</b>	0,00
<b>Clash score</b>	4,00
<b>Média B-factor</b>	18,54
<b>macromoléculas</b>	15,44
<b>ligantes</b>	34,37
<b>solventes</b>	31,05
<b>Número de grupos TLS</b>	6
<b>PDB</b>	6EAU

Mesmo com a ausência da ligação de dissulfeto o ptryp8 em complexo com tripsina foi capaz de reconhecer o sítio S1 e se ligar como demonstrado na comparação com as outras estruturas de inibidores (Figura 38).



**Figura 38.** Sobreposição do ptryp8 com outros inibidores derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvida por cristalografia de raios X. As cadeias principais da tripsina estão representadas em *ribbons* e os peptídeos em *sticks*. A seta indica a posição do resíduo Cys<sup>8</sup> do ptryp8.

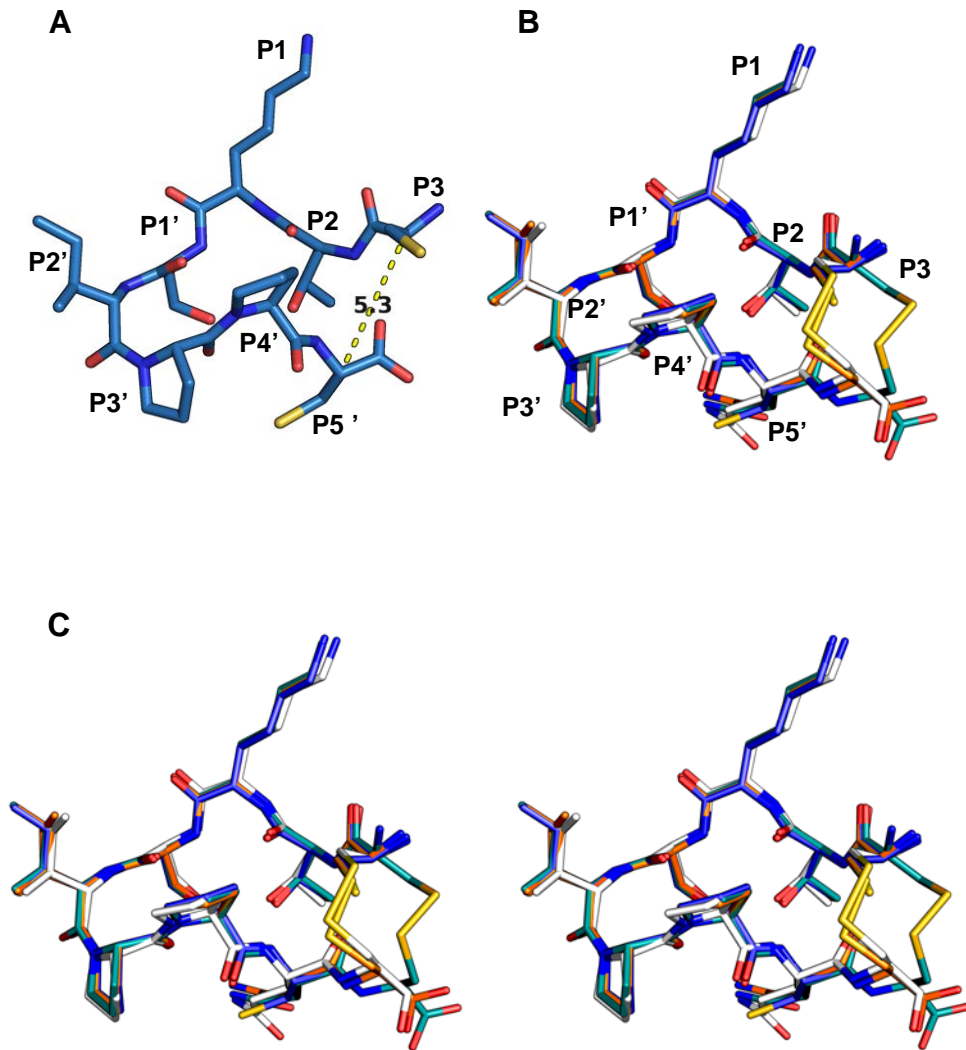
Uma comparação das posições dos C $\alpha$  das estruturas sobrepostas demonstra uma semelhança estrutural do ptryp8 com as estruturas do ptryp9-L, ptryp9-D e BTC1 (Tabela 17).

**Tabela 17.** RMSD das sobreposições do peptídeo ptryp8, ptryp9-D, ptryp9-L e BTC1. N\* representa o número de C $\alpha$  usados no cálculo do RMSD.

	ptryp9-L	ptryp9_D	BTC1
ptryp8	0,380	0,375	0,334
N*	6	7	7

O ptryp8 assim como o ptryp9 apresentou em sua posição P3' a presença de uma *cis*-prolina como já descrito sendo uma característica a dos inibidores da família BBI (McBride, J. D *et al*, 1998). A demonstração da distância entre os C $\alpha$  da Cys<sup>1</sup> e Cys<sup>8</sup> foi demonstrada (Figura 39 A). A distância entre os C $\alpha$  mostram que a ponte de dissulfeto não estava presente na estrutura devido a sua distância ser 5,3 Å. A sobreposição do ptryp8 com o ptryp9 e BTC1 mostrou que os

resíduos que fazem contato na interface se mantiveram na mesma posição (Figura 39 B)

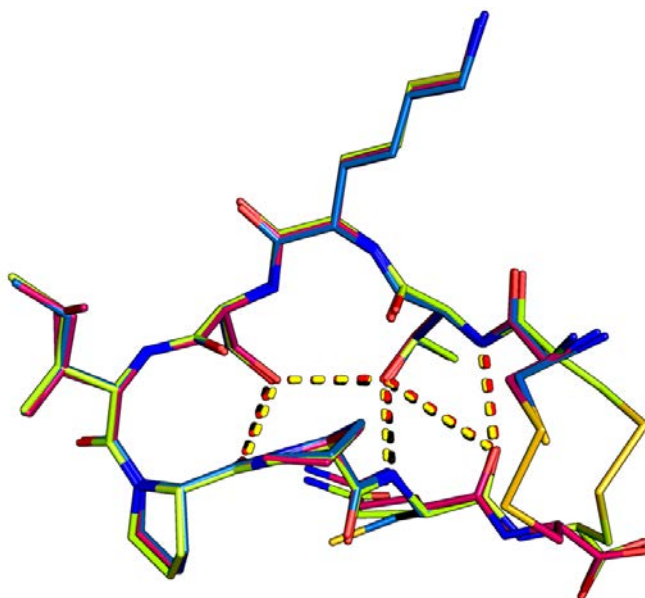


**Figura 39.** Modelo tridimensional do ptryp8 e a superposição dos peptídeos derivados. **A)** Modelo tridimensional do ptryp8. Destacado em amarelo a distância entre os C $\alpha$  da Cys<sup>1</sup> e Cys<sup>8</sup>. **B)** Sobreposição do ptryp8 (azul) com o peptídeo do BTCl (branco), ptryp9-L (laranja) e ptryp-D (ciano). **C)** *Stereo View (crossed eye)* da sobreposição do ptryp8 (azul) com o peptídeo do BTCl (branco), ptryp9-L (laranja) e ptryp-D (ciano).

O complexo entre a ptryp8 e tripsina foi depositado no PDB com o código de 6EAU.

### 5.3.3 Análise da interface do complexo ptryp8 e a tripsina

A redução de um resíduo na sequência do peptídeo ptryp8 não afetou o número de contatos entre o ptryp8 e a tripsina em comparação com ptryp9 (Tabela 18). A Lys<sup>3</sup> na posição P1 do ptryp8 mostra uma semelhança nos contatos presentes no ptryp9 e BTCl com exceção da Gln<sup>8</sup> que foi o resíduo removido. Essa semelhança estrutural também é notada com conservação dos contatos na posição P1 de ptryp8 com o sítio S1 da tripsina. O resíduo de Thr<sup>2</sup> na posição P2 também manteve seu contato com a tripsina, demonstrando o que foi descrito por Brauer e Song, onde, foi descrito que a Thr<sup>2</sup> é o resíduo ideal para inibição de tripsina nessa posição (Brauer AB, *et al.*, 2003; Song HK *et al.*, 1999). Além dos contatos com a interface com a tripsina, os contatos intramoleculares do ptryp8 foi conservado em comparação com o ptryp9-L e ptryp9-D (Figura 40).



**Figura 40.** Sobreposição dos peptídeos ptryp8 (azul), ptryp9-L (magenta) e ptryp9-D (verde). As interações intramoleculares estão destacadas em amarelo (ptryp8), preto (ptryp9-L) e vermelho (ptryp9-D).

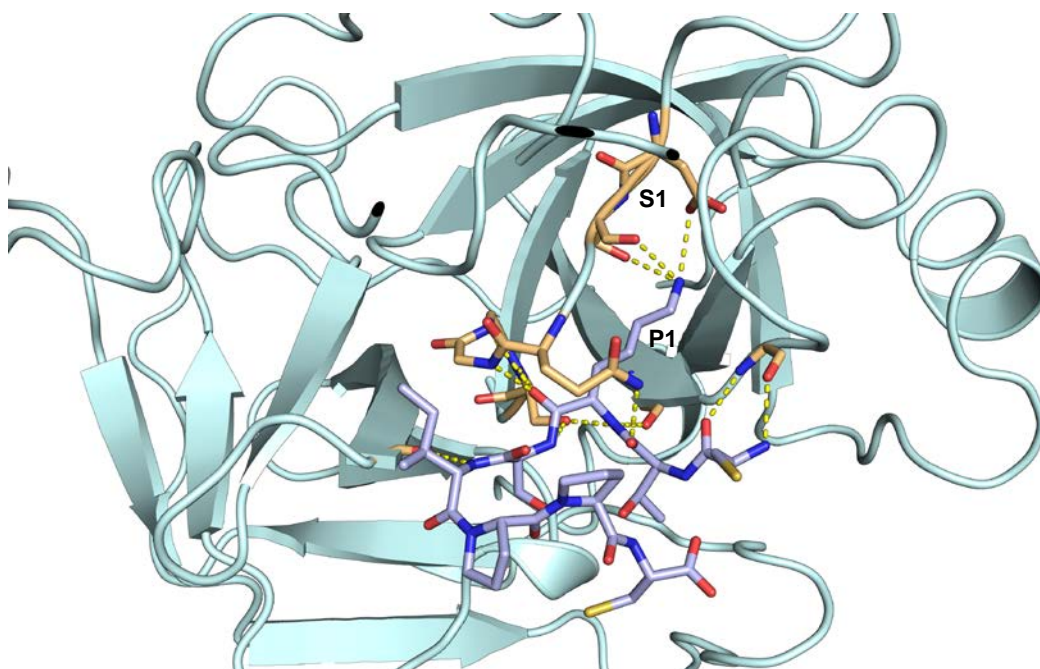
A sobreposição estrutural e os contatos da interface entre o ptryp8 e tripsina demonstrou que o resíduo Cys<sup>1</sup> adota uma conformação semelhante ao ptryp9-L devido aos contatos da cadeia principal do Cys<sup>1</sup> com a tripsina.

Os átomos de nitrogênio da Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> da cadeia principal do ptryp8 fazem os mesmos contatos que o ptryp9-L e o BTCl, mostrando a afinidade pelo bolsão S1 (Figura 41). Os resíduos Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> são os resíduos importantes devido a sua interação com a Ser<sup>195</sup> catalítica (Figura 12).

**Tabela 18.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp8, ptryp9-L e BTCl. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCl.

Ptryp8	Dis*	Tripsina	Ptryp9 - L	Dis*	Tripsina	BTCl	Dis*	Tripsina
						Cys22 - O	2,8	Ser217 - OG
Cys1 - O	3,0	Gly216 - N	Cys1 - O	3,1	Gly216 - N	Cys24 - O	3,1	Gly216 - N
Cys1 - N	2,8	Gly216 - O	Cys1 - N	2,7	Gly216 - O	Cys24 - N	2,9	Gly216 - O
Thr2 - O	2,8	Gln192 - NE2	Thr2 - O	2,8	Gln192 - NE2			
Lys3 - N	3,1	Ser214 - O	Lys3 - N	3,0	Ser214 - O	Lys26 - N	3,1	Ser214 - O
Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys26 - N	2,8	Ser195 - OG
Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - OG	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - OG	Lys26 - NZ	3,0	Ser190 - OG
Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - O	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - O	Lys26 - NZ	2,9	Ser190 - O
Lys3 - NZ	3,1	Asp189 - OD1	Lys3 - NZ	3,0	Asp189 - OD1	Lys26 - NZ	3,1	Asp189 - OD1
Lys3 - O	2,7	Ser195 - N	Lys3 - O	2,7	Ser195 - N	Lys26 - O	2,8	Ser195 - N
Lys3 - O	2,7	Asp194 - N	Lys3 - O	3,2	Asp194 - N	Lys26 - O	3,3	Asp194 - N
Lys3 - O	2,5	Gly193 - N	Lys3 - O	2,6	Gly193 - N	Lys26 - O	2,7	Gly193 - N
Ser4 - N	2,9	Ser195 - OG	Ser4 - N	2,9	Ser195 - OG	Ser27 - N	3,0	Ser195 - OG
Ile5 - N	2,9	Phe41 - O	Ile5 - N	3,0	Phe41 - O	Ile28 - N	3,0	Phe41 - O
			Gln8 - NE2	2,7	His57 - O			
						Ile28 - O	2,8	Lys60 - N <sup>B</sup>
						Arg33 - NH2	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH1	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH2	3,2	Asn97 - O

Os resultados aqui mostram o quão importante é a presença da ponte de dissulfeto para fornecer estabilidade e rigidez para os inibidores, pois os peptídeos lineares nas quais as cisteínas estão ausentes não apresentam atividade inibitória (Descours, A. *et al*, 2002; Domingo, G. *et. al.*, 1995). Portanto, isso sugere que a restrição conformacional imposta pela ligação dissulfeto nos peptídeos cíclicos são essenciais para a manutenção da estrutura secundária e estabilidade desse tipo de inibidores.



**Figura 41.** Contatos do ptry8 com a tripsina. A tripsina (azul) está representada em *cartoon* e os resíduos que fazem contato com o ptry8 (cinza) destacados em laranja. Os contatos estão destacados em amarelo.

### 5.3.4 Área acessível ao solvente

A ASA demonstrou que os Thr<sup>2</sup>, Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> são os resíduos que apresentam a maior AE devido a sua ligação direta no sítio S1 (Figura 42). A ASA do ptry8 mostrou a mesma similaridade dos peptídeos ptry9-L e ptry9-D (Tabela 19). O peptídeo ptry8 não apresenta o resíduo de Gln da estrutura original. A diminuição na sequência ocasionou uma diminuição da ASA total, c, porém, a AE aumentou devido aos resíduos que foram mantidos são os que interagem com a interface da tripsina (Tabela 20).

**Tabela 19.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptry9 – L, ptry9 – D, ptry8, peptídeo do BTC1.

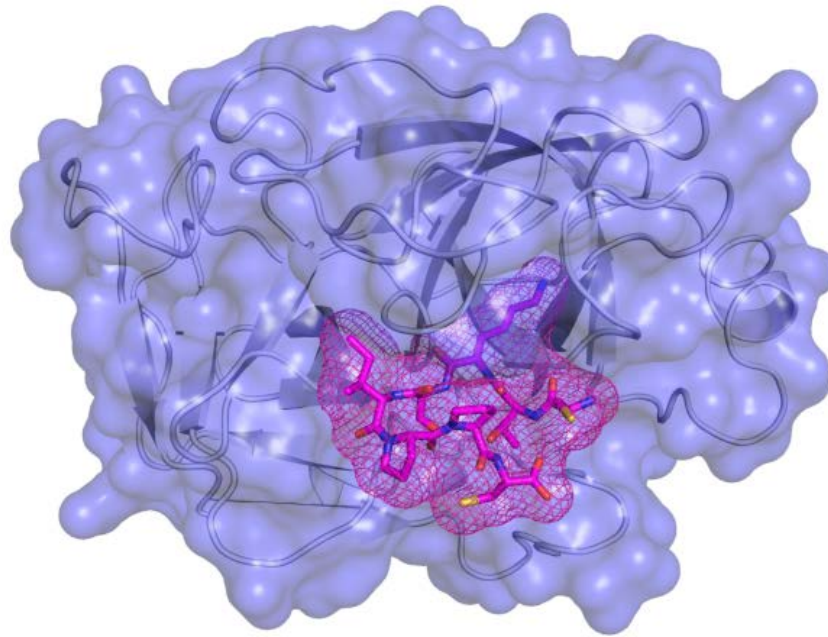
	Grupo espacial	Área acessível total	Área acessível enterrada	Porcentagem enterrada	Nº de resíduos na superfície	Nº de resíduos na interface
<b>ptry9 - L</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1024,4	572,2	55,9%	9	8

<b>ptryp9 - D</b>	<i>P3<sub>2</sub>21</i>	1070,3	580,9	54,3%	9	9
<b>ptryp8</b>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	947,8	550,8	58,1%	8	8
<b>Pep-BTCI</b>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></i>	1031,9	521,2	50,5%	9	8

**Tabela 20.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp8, ptryp9-L e BTCI.

Resíduo	Ptryp8			Resíduo	Ptryp9-L			Resíduo	BTCI		
	ASA	AE	AE%		ASA	AE	AE%		ASA	AE	AE%
CYS1	140,91	59,24	42,04	CYS1	109,52	58,22	53,16	ARG21	165,73	39,2	23,65
THR2	74,30	72,79	97,97	THR2	64,11	63,61	99,22	CYS22	38,26	23,29	60,87
LYS3	199,82	199,69	99,93	LYS3	202,04	202,04	100	GLU23	91,34	67,04	73,40
SER4	56,07	51,24	91,39	SER4	43,51	40,34	92,71	CYS24	52,19	41,27	79,08
ILE5	177,20	139,1	78,54	ILE5	175,45	137,63	78,44	THR25	67,88	49,1	72,33
PRO6	92,88	6,36	6,85	PRO6	98,39	6,87	6,68	LYS26	208,35	207,92	99,79
PRO7	82,50	20,60	24,97	PRO7	75,06	16,58	22,09	SER27	49,37	45,55	92,26
CYS8	123,13	6,40	5,20	GLN8	117,44	46,90	39,94	ILE28	165,95	126,82	76,42
				CYS9	138,87	0,00	0	PRO29	86,41	15,74	18,22
								PRO30	48,58	14,15	29,13
								GLN31	89,76	21,44	23,89
								ARG33	123,23	61,54	49,94
								SER35	42,8	15,14	35,37
								ILE64	99,19	10,2	10,28
								CYS68	58,6	1,32	2,25





**Figura 42.** ASA do peptídeo ptryp8 em complexo com a tripsina. A superfície da tripsina em azul claro e a superfície do ptryp8 em magenta. A tripsina esta demonstrada em *cartoon* e o peptídeo destacado em *sticks* e a ASA do ptryp8 em *mesh*. As cisteínas estão destacadas em amarelo.

### 5.3.5 Fatores de temperatura do peptídeo ptryp8

Dos 8 resíduos modelados do ptryp8, os resíduos Thr<sup>2</sup>, Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> apresentaram os menores valores para o fator de temperatura (Tabela 21). Os baixos fatores de temperatura desses resíduos são atribuídos aos extensos contatos polares com a tripsina (Tabela 18). Pode-se notar uma tendência de que os resíduos mais longes da Lys<sup>3</sup> aumentem seu fator de temperatura devido aos menores contatos com a tripsina o que reflete em uma maior vibração dos átomos e um maior fator de temperatura.



**Tabela 21.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp8.

Resíduo	Cys1	Thr2	Lys3	Ser4	Ile5	Pro6	Pro7	Cys8	
<b>Átomo / fatores de temperatura individuais</b>			O - 13,54		O - 23,58	O - 24,49	O - 29,82	O - 21,46	
	O - 17,71	O - 14,99	N - 13,46	O - 16,72	N - 18,68	N - 24,45	N - 26,82	N - 29,01	
	N - 24,04	N - 16,36	CA - 13,19	N - 15,47	C - 20,22	CA - 25,42	CA - 28,27	CA - 38,90	
	CA - 23,23	CA - 15,49	C - 13,84	CA - 16,79	CA - 22,67	C - 25,62	C - 29,18	C - 43,80	
	C - 18,47	C - 14,53	CB - 14,18	C - 17,29	CB - 21,63	CB - 26,21	CB - 28,51	CB - 34,65	
	CB - 26,97	CB - 16,80	CG - 14,69	CB - 17,82	CG1 - 22,62	CG - 26,88	CG - 28,43	SG - 65,50	
	SG - 29,80	OG1 - 17,94	CD - 13,94	OG - 18,99	CG2 - 22,17	CD - 26,00	CD - 27,74	OXT - 48,42	
		CG2 - 17,56	CE - 14,41		CD1 - 24,69				
		NZ - 14,34							
<b><math>\bar{X}</math> Fator de temperatura</b>	<b>23,37</b>	<b>16,24</b>	<b>13,95</b>	<b>17,18</b>	<b>22,03</b>	<b>25,58</b>	<b>28,40</b>	<b>40,25</b>	<b><math>\bar{X} = 23,38</math></b>
<b>Ocupância</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	

$\bar{X}$  = Média

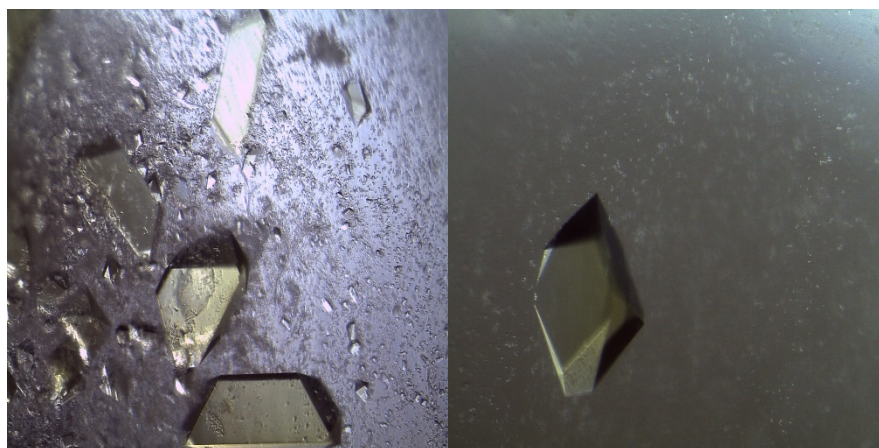
## 5.4 Complexo ptryp7 e tripsina

### 5.4.1 Cristalização do complexo e coleta de dados

De todas as condições de cristalização testadas, 12 se apresentaram as mais promissoras para a cristalização do complexo entre o ptryp7 e a tripsina (Tabela 22). Das condições testadas, os melhores cristais aparecem na condição: HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1,5 M (Figura 43).

**Tabela 22.** Condições de cristalização do complexo ptryp7 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

Conjunto	Condição de cristalização	Crioproteção
Ptryp7_1	Sulfato de amônio 0,2 M; MES monohidratado 0,1M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol monometil éter 5000	10% de glicerol
Ptryp7_2	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1 M	15% de glicerol
Ptryp7_3	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; 2% w/v Polietilenoglicol 400; 2,0 M Sulfato de amônio	
Ptryp7_4	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sódio 0,1M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 8000	
Ptryp7_5	HEPES sódio 0,1M pH 7,5; 10 % v/v 2-Propanol; 20 % w/v Polietilenoglicol 4000	20% de glicerol
Ptryp7_6	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sódio 0,1 M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 8000	
Ptryp7_7	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; 2% w/v Polietilenoglicol 400; Sulfato de amônio 2,0 M	
Ptryp7_8	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1 M	
Ptryp7_9	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,	
Ptryp7_10	Sulfato de amônio 0,2 M; MES 0,1 M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 5000	
Ptryp7_11	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sodio 0,1 M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 8000	
Ptryp7_12	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sódio 0,1 M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 8000	



**Figura 43.** Imagens dos cristais do complexo entre ptryp9 e tripsina. Os cristais foram obtidos na condição com sulfato de lítio monohidratado 1 M; HEPES sódio 0,1 M pH 7,5.

Todos os 12 cristais foram coletados no detector Pilatus 2M em diferentes  $\lambda$  (Tabela 23). Assim como o ptryp9 o processamento de dados mostrou que o peptídeo foi cristalizado em dois grupos espaciais diferentes,  $P2_12_12_1$  ortorrômbico e  $P4_12_12$  tetragonal.

**Tabela 23.** Dados da coleta do complexo Ptryp7 com tripsina.

Conjunto	Comprimento de onda (Å)	Detector	Grupo espacial
Ptryp7_1	1,46	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_2	1,30	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_3	1,30	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_4	1,30	Pilatus 2M	$P4_12_12$
Ptryp7_5	1,30	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_6	1,30	Pilatus 2M	$P4_12_12$
Ptryp7_7	1,30	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_8	1,30	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_9	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_10	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_11	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp7_12	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$

Todos os conjuntos foram coletados e processados (Tabela 24). Dos 12 conjuntos coletados os conjuntos no grupo espacial  $P4_12_12$  (ptryp7\_4 e ptryp7\_6) foram colocados na maior resolução possível para fins comparativos. Apesar do conjunto ptryp7\_6 apresentar maior multiplicidade devido a ter mais reflexões

coletadas, ele é um conjunto inferior ao ptryp7\_4 nas demais estatísticas de processamento. De todos os conjuntos processados no espacial *P41212* o conjunto ptryp7\_9 foi o que apresentou os melhores valores estatísticos (Tabela 24).

O conjunto ptryp7\_04 apresenta valores de célula unitária de  $A = 60,09$ ,  $B = 61,49$  e  $C = 66,54$  Å com uma resolução de  $1,39$  Å. O conjunto ptryp7\_9 apresenta valores de célula unitária de  $A = 54,25$ ,  $B = 54,25$  e  $C = 181,195$  Å com resolução de  $1,29$  Å.

**Tabela 24.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp7 com a tripsina. Estatísticas para a camada de mais alta resolução são mostradas entre parênteses.

Conjunto	Resolução o máxima (Å)	Reflexões Obs - Únicas	Multiplici- dade	Completeza (%)	$I/\sigma$	$R_{meas}$ (%)	CC (1/2)
Ptryp7_1	1,79	145532 - 34812 (17265 - 5526)	4,18 (3,12)	99,3 (97,5)	13,55 (1,92)	7,0 (71,8)	99,8 (75,2)
Ptryp7_2	1,29	270935 - 94614 (19437 - 12264)	2,86 (1,58)	92,8 (74,2)	18,25 (2,94)	4,4 (26,2)	99,8 (91,3)
Ptryp7_3	1,56	309410 - 72824 (38376 - 11383)	4,25 (3,37)	99,2 (95,9)	16,60 (2,26)	5,5 (64,3)	99,9 (85,1)
<b>Ptryp7_4</b>	1,39	749082 - 102923 (63897 - 16007)	7,28 (3,99)	99,1 (95,2)	15,87 (1,50)	6,9 (65,0)	99,9 (85,9)
Ptryp7_5	1,66	192571 - 42734 (27981 - 6623)	4,51 (4,22)	97,4 (93,6)	15,73 (2,57)	6,2 (57,7)	99,9 (82,2)
Ptryp7_6	1,39	854070 - 97369 (72082 - 13933)	8,77 (5,17)	94,9 (84,0)	24,11 (1,04)	5,0 (166,9)	100,0 (67,6)
Ptryp7_7	1,37	267794 - 83853 (22007 - 12972)	3,19 (1,70)	97,9 (93,6)	12,27 (1,18)	6,6 (80,6)	99,8 (67,3)
Ptryp7_8	1,35	411030 - 106187 (31085 - 13666)	3,87 (2,27)	92,6 (73,7)	19,72 (1,43)	4,2 (76,4)	99,9 (72,1)
<b>Ptryp7_9</b>	1,29	1008806 - 119399 (86802 - 18813)	8,45 (4,61)	99,3 (96,4)	21,69 (2,22)	5,6 (66,8)	99,9 (83,7)
Ptryp7_10	1,34	952411 - 106754 (97795 - 16303)	8,92 (6,00)	98,9 (93,5)	21,32 (1,85)	6,5 (65,3)	100,0 (90,0)
Ptryp7_11	1,41	844486 - 90563 (97617 - 14080)	9,32 (6,93)	99,1 (95,3)	20,16 (2,82)	7,3 (85,3)	99,9 (89,6)
Ptryp7_12	1,29	1000970 - 119717 (85827 - 18405)	8,36 (4,56)	98,9 (93,8)	24,62 (1,80)	5,9 (72,0)	100,0 (81,4)

## 5.4.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptryp7 e tripsina

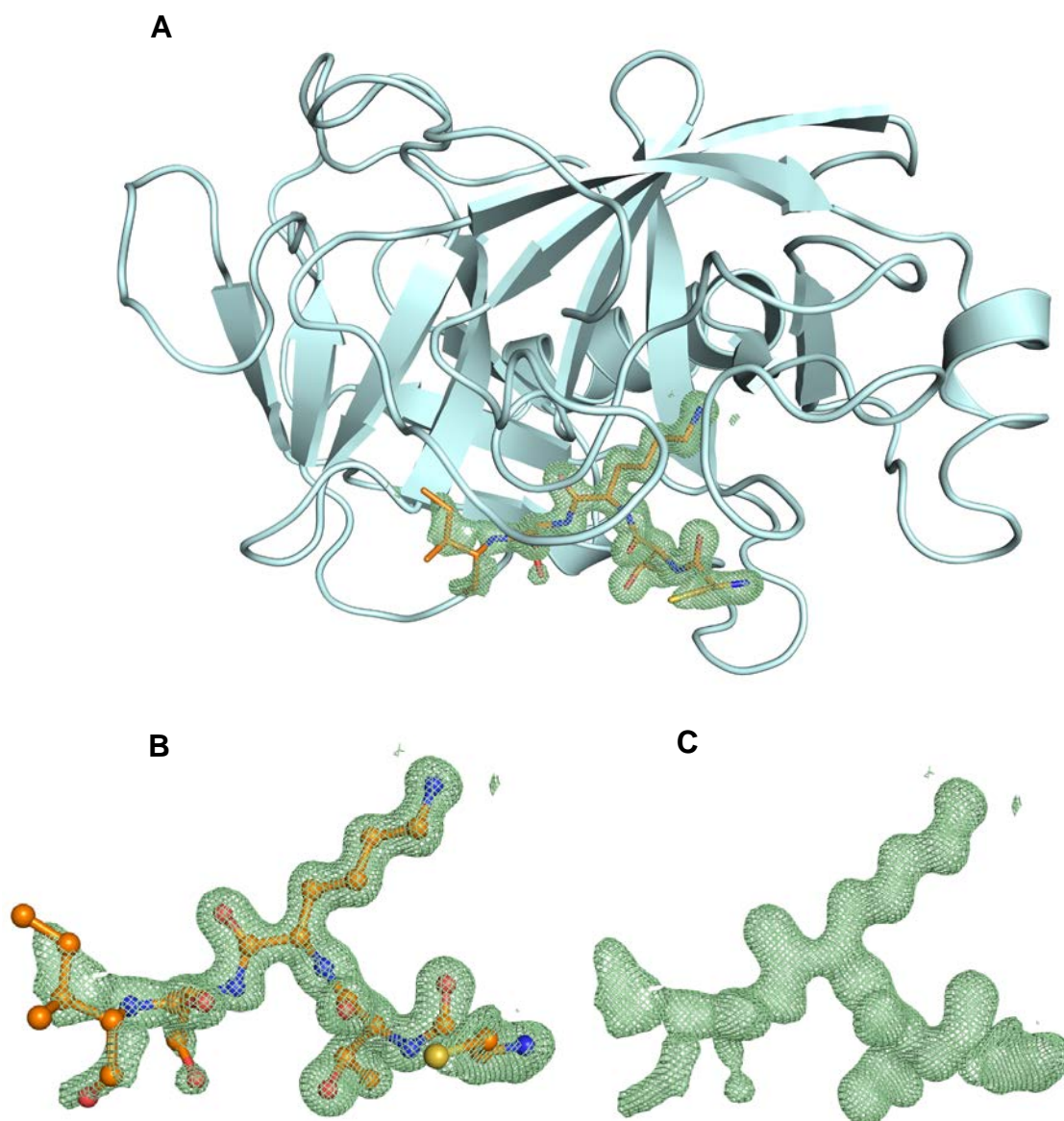
Os conjuntos ptryp7\_4 e ptryp7\_9 apresentaram os melhores valores estatísticos de procesamento e foram refinados (Tabela 25) e seus modelos construídos (Figura 44 e 45).

Para fácil entedimento, o peptídeo ptryp7 resolvido do conjunto ptryp7\_4 foi denominado de ptryp7<sup>tetra</sup> e o peptídeo ptryp7 resolvido do conjunto ptryp7\_9 foi denominado ptryp7<sup>orto</sup>, essas denominações foram dadas por estarem relacionadas com o grupo espacial no qual foram cristalizadas e resolvidas as estruturas.

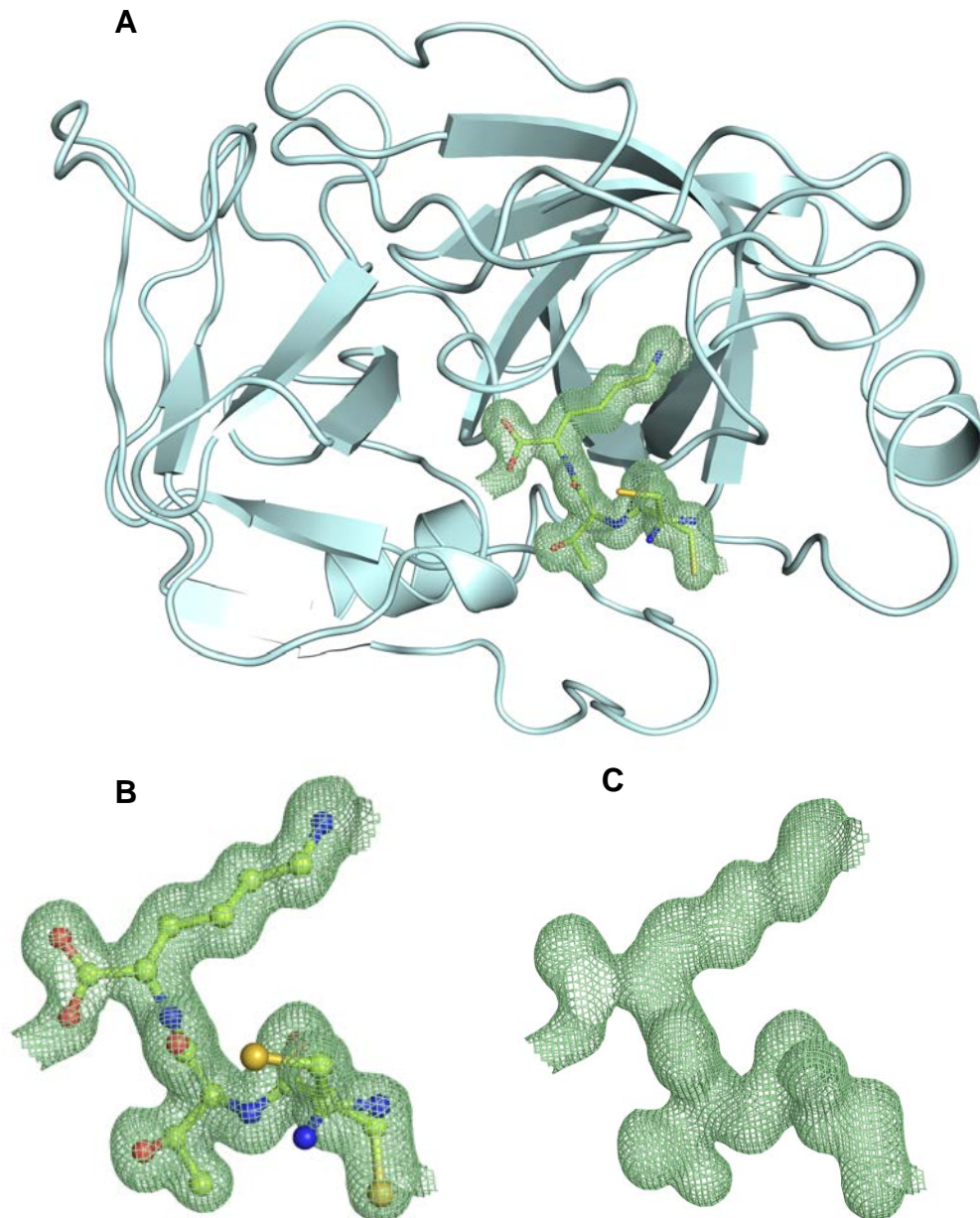
Inicialmente o peptídeo ptryp7<sup>tetra</sup> e ptryp7<sup>orto</sup> foram desenhados para ter 7 resíduos em sua sequência (CTKSIPC). A densidade eletrônica do peptídeo ptryp7<sup>tetra</sup> demonstrou que apenas 5 resíduos conseguiram ser modelados (CTKSI), os demais não apresentaram densidade suficiente. A densidade do ptryp7<sup>tetra</sup> demonstra que a ponte de dissulfeto inicialmente desenhada não foi vista na estrutura (Figura 44 B). Uma hipótese de não notar a densidade eletrônica dos resíduos de Pro<sup>6</sup> e Cys<sup>7</sup> ausentes no ptryp7<sup>tetra</sup> são as suas mobilidades estruturais, devido estarem localizados no C-terminal. Como descrito os BBIs naturais apresentam em sua sequência uma *cis*-Pro<sup>6</sup> e uma Pro<sup>7</sup> conservadas nas posições P3' e P4', respectivamente (Brauer, A. *et. al.*, 2001; McBride, J. D., *et al*, 2002) (Figura 10). Portanto, a redução na sequência consenso na qual a Pro<sup>7</sup> foi removida, ocasionou a perda da estabilidade conferida por esse resíduo. A Pro<sup>7</sup> estabiliza a *cis*-Pro<sup>6</sup>, devido a redução na sequência a Pro<sup>7</sup> foi removida, e conseqüentemente a estabilidade perdida. O resíduo de Cys<sup>7</sup> do peptídeo ptryp7<sup>tetra</sup> não foi capaz de fornecer estabilidade suficiente, assim, os resíduos Pro<sup>6</sup> e Cys<sup>7</sup> não foram observados na densidade eletrônica (Figura 44, B).

A densidade eletrônica do ptryp7<sup>tetra</sup> mostrou que não foi possível observar a ligação de dissulfeto (Cys<sup>1</sup> e Cys<sup>7</sup>), conseqüentemente sua estabilidade e rigidez não pode ser observada, mostrando a linearidade do peptídeo. Devido a linearidade do ptryp7, ele ficou suscetível a ação de clivagem da tripsina. A vulnerabilidade do ptryp7 foi observada na estrutura do ptryp7<sup>orto</sup> (Figura 45). A

resolução da estrutura cristalográfica do complexo no grupo espacial  $P2_12_12_1$  mostrou que o peptídeo ptryp7<sup>orto</sup> foi clivado pela tripsina e depois cristalizado (Figura 45). Devido a linearidade, falta de estabilidade conferida pela ponte de dissulfeto, a presença de um resíduo carregado positivamente (Lys<sup>3</sup>) e o ambiente químico (pH) forneceram condições ideais para a clivagem do ptryp<sup>7</sup>. Devido a alta concentração de peptídeos usados nos ensaios de cristalização sugere-se que após a clivagem a cristalização do ptryp7<sup>orto</sup> com apenas 3 resíduos (CTK) foi favorecida pelo empacotamento cristalino no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . De acordo com a densidade pode-se observar que a tripsina clivou o ptryp7<sup>orto</sup> mostrando o resíduo Lys<sup>3</sup> como C-terminal da estrutura e uma dupla conformação para o resíduo de Cys<sup>1</sup> (Figura 45, B).



**Figura 44.** Modelo tridimensional do complexo ptry7<sup>tetra</sup> e tripsina no grupo espacial  $P4_12_12$ . **A)** Modelo do complexo entre ptry7<sup>tetra</sup> (laranja) e tripsina (ciano). A tripsina esta representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *stick*. **B)** Modelo do ptry7<sup>tetra</sup> está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o - F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,0$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. **C)** *Omit map*  $2F_o - F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,0$  do peptídeo em verde.



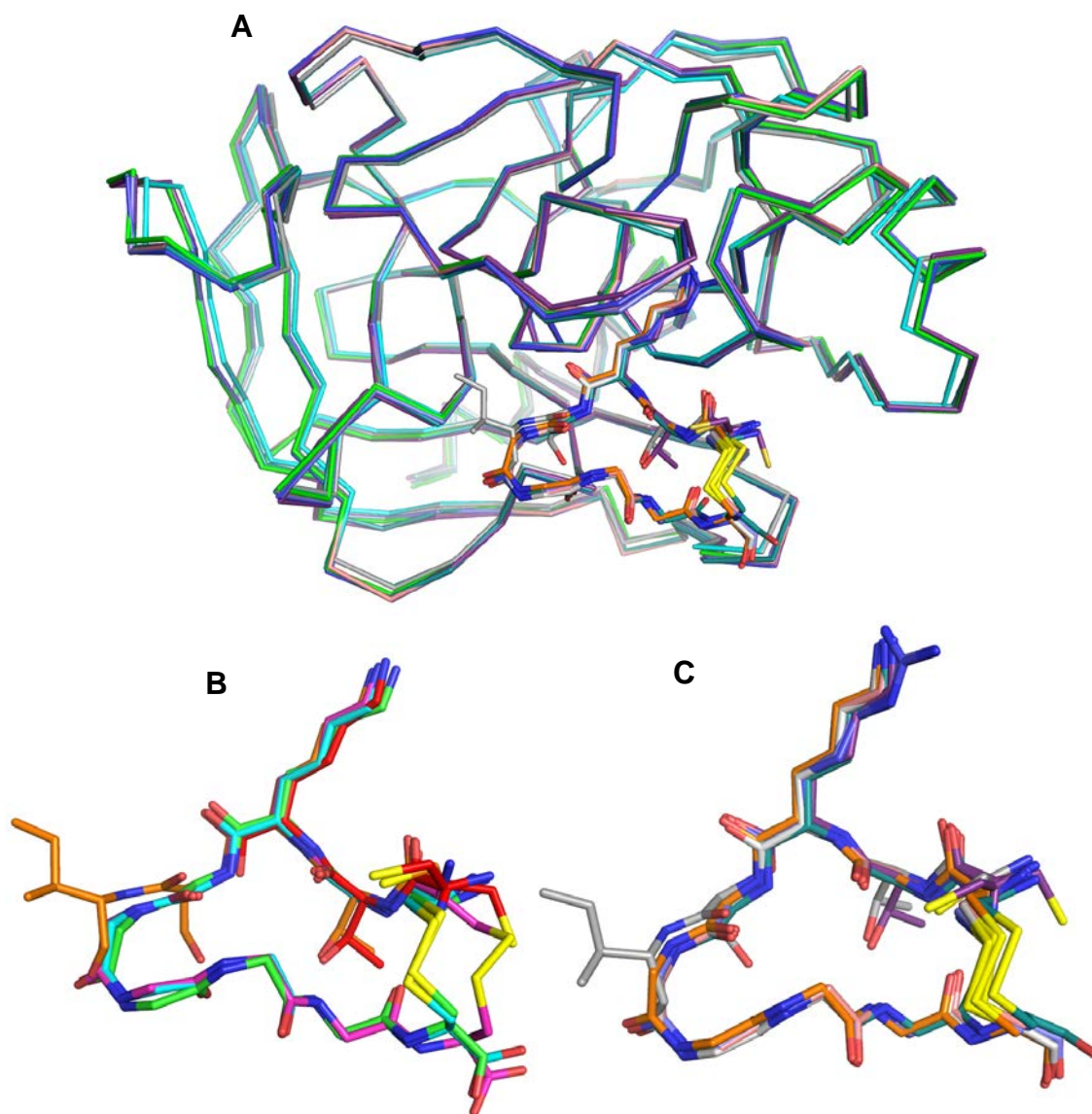
**Figura 45.** Modelo tridimensional do complexo ptryp7<sup>ortho</sup> e tripsina no grupo espacial  $P2_12_12_1$ . **A)** Modelo do complexo entre ptryp7<sup>ortho</sup> (verde) e tripsina (ciano). A tripsina está representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *sticks* e esferas. **B)** Modelo do ptryp7<sup>ortho</sup> está encoberto pela densidade eletrônica de um *omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,0$  (verde), os enxofres das cisteínas estão destacados em amarelo. A densidade do ptryp7<sup>ortho</sup> mostrou uma dupla conformação para a cys1 e o C-Terminal na Lys<sup>3</sup>. **C)** *Omit map*  $2F_o-F_c$  com um contorno de  $\sigma = 1,0$  do peptídeo em verde.



**Tabela 25.** Estatísticas do processamento e refinamento do conjunto de dados do ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup>. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

Conjunto	ptryp7 <sup>orto</sup>	ptryp7 <sup>tetra</sup>
<b>Comprimento de onda (Å)</b>	1,20	1,20
<b>Limite de resolução</b>	27,38 - 1,29 (1,33 - 1,29)	29,28 - 1,39 (1,44 - 1,39)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<b>Célula unitária (a, b, c) (Å)</b>	60,09 61,49 66,54	54,25 54,25 181,195
<b>Total de reflexões</b>	1008734 (48602)	748920 (36502)
<b>Reflexões únicas</b>	119389 (5972)	102896 (5058)
<b>Multiplicidade</b>	8,4 (4,3)	7,3 (3,8)
<b>Completeza (%)</b>	99,42 (95,73)	99,13 (93,49)
<b>Média I/sigma (I)</b>	21,69 (2,20)	15,87 (1,31)
<b>Wilson B-factor</b>	13,21	15,16
<b>R-merge</b>	0,0534 (0,690)	0,0645 (0,638)
<b>R-meas</b>	0,0564 (0,788)	0,0689 (0,736)
<b>R-pim</b>	0,0181 (0,374)	0,0236 (0,353)
<b>CC1/2</b>	0,999 (0,775)	0,999 (0,778)
<b>CC*</b>	1 (0,935)	1 (0,935)
<b>Reflexões usadas no refinamento</b>	62501 (5967)	55032 (5058)
<b>Reflexões usadas no R-free</b>	1987 (185)	1999 (184)
<b>R-work</b>	0,144 (0,310)	0,145 (0,275)
<b>R-free</b>	0,157 (0,305)	0,177 (0,303)
<b>CC(work)</b>	0,975 (0,882)	0,978 (0,888)
<b>CC(free)</b>	0,971 (0,887)	0,964 (0,898)
<b>Número de átomos sem hidrogênio</b>	2041	2024
<b>macromoléculas</b>	1694	1708
<b>Ligantes</b>	26	1
<b>Solvente</b>	321	315
<b>Resíduos de proteína</b>	228	226
<b>RMS(bonds)</b>	0,024	0,008
<b>RMS(angles)</b>	1,48	0,97
<b>Ramachandran favored (%)</b>	98,66	99,10
<b>Ramachandran allowed (%)</b>	1,34	0,90
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Rotamer outliers (%)</b>	0,00	0,00
<b>Clashscore</b>	5,30	2,93
<b>Média B-factor macromoléculas</b>	18,26	21,41
<b>ligantes</b>	15,70	19,37
<b>Solvente</b>	35,40	15,06
<b>Solvente</b>	30,37	32,46
<b>Número de gurpos de TLS</b>	8	5
<b>PDB</b>	6EAW	6EAV

A sobreposição mostra que mesmo reduzidos ou clivados os ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup> apresentam a mesma conformação das demais estruturas (Figura 46).



**Figura 46.** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup> com outros peptídeos derivados de BBIs. **A)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>orto</sup>(roxo) e ptryp7<sup>tetra</sup> (cinza) com outros peptídeos derivados de BBIs naturais em complexo com a tripsina resolvidos por cristalografia de raios X. As tripsinas estão representadas em *ribbons* e os peptídeos em *sticks*. **B)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> (vermelho) e ptryp7<sup>tetra</sup> (laranja) com os peptídeos ptryp9-L (ciano), ptryp9-D (roxo) e BTCL (verde). **C)** Sobreposição dos peptídeos ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup> com outros inibidores derivados de BBIs.

O peptídeo ptryp7<sup>ortho</sup> foi depositado no PDB com o código de 6EAW e o peptídeo ptryp7<sup>tetra</sup> foi depositado no PDB com o código de 6EAV.

### 5.4.3 Análise da interface do complexo ptryp7 e a tripsina

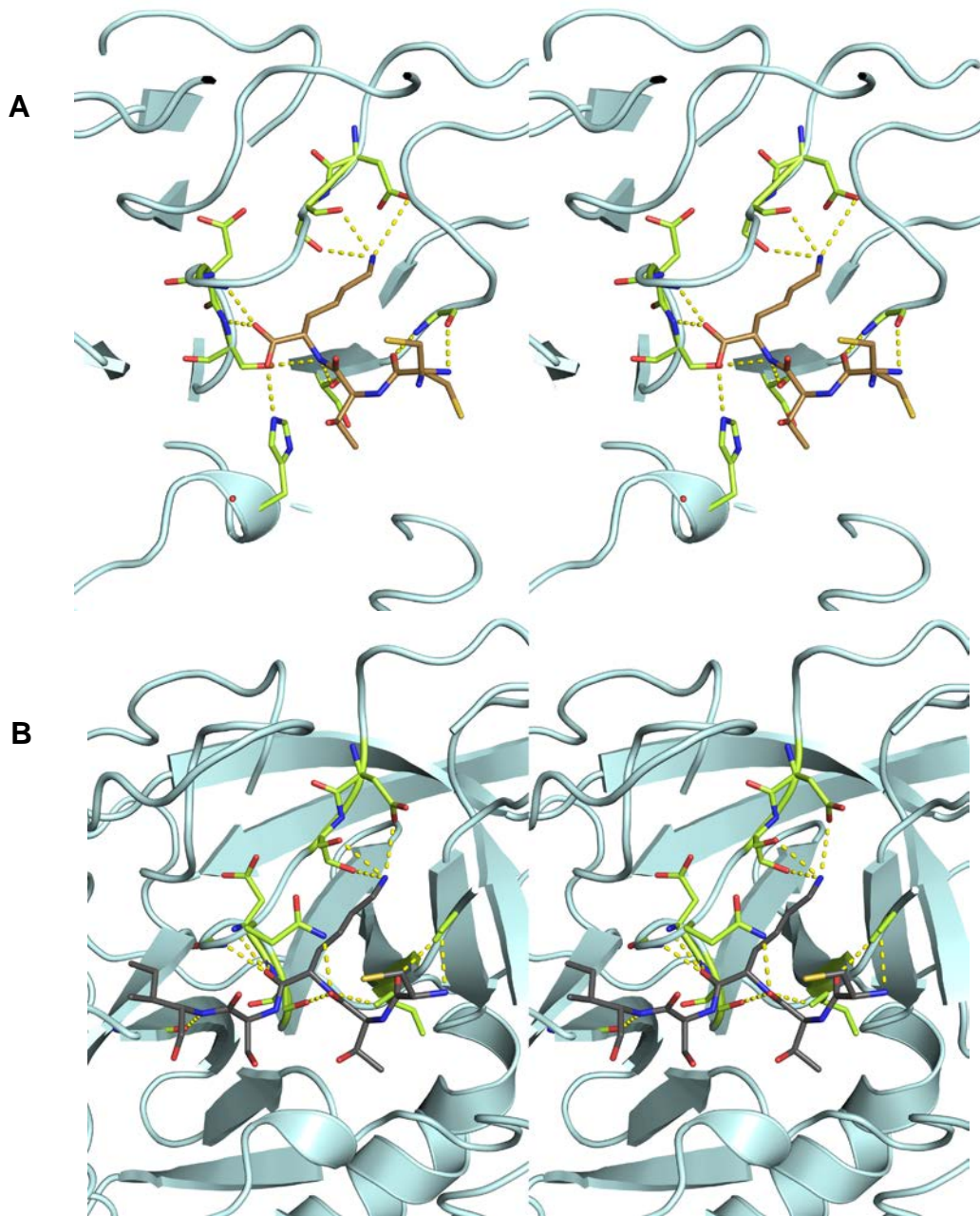
Os resultados da interface entre os peptídeos ptryp7<sup>ortho</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup> mostram que a afinidade do resíduo Lys<sup>3</sup> pela bolsão S1 da tripsina se manteve (Tabela 26).

Os contatos foram mapeados e mostrados na figura 47. O ptryp7<sup>ortho</sup> que foi clivado e depois cristalizado com a tripsina mostrou apenas 2 resíduos interagindo com a tripsina. Mesmo notando que a Lys<sup>3</sup> do ptryp7<sup>ortho</sup> apresenta interações com o resíduo catalítico Ser<sup>195</sup>, a mesma perdeu os demais contatos adjacentes que estabilizam a estrutura. A análise da interface do ptryp7<sup>ortho</sup> nos sugere que uma vez que os peptídeos tenham sido clivados, eles não são mais capazes de agir como inibidores demonstrando que a sensibilidade dos peptídeos à clivagem é dependente da sua sequência e da sua estrutura e não necessariamente se correlaciona com potência inibitória.

Nota-se uma tendência dos contatos do peptídeo ptryp7<sup>tetra</sup> em se distanciar da interface da tripsina, sugerindo que essas interações sejam mais fracas no ptryp7<sup>tetra</sup> em relação aos demais peptídeos derivados do BTCl. Portanto, vinculando a diminuição das interações, a estrutura linear do ptryp7 e conseqüentemente a perda de estabilidade, sugere que esses fatores estruturais justificam a incapacidade do ptryp7 em inibir a tripsina.

**Tabela 26.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp7<sup>orto</sup>, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp9-L e BTCl. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCl.

Ptryp7 <sup>orto</sup>	Dis*	Trip	Ptryp7 <sup>tetra</sup>	Dis*	Trip	Ptryp9-L	Dis*	Trip	BTCl	Dis*	Trip
									Cys22 - O	2,8	Ser217 - OG
Cys1-O	3,1	Ser214-O	Cys1-O	3,0	Gly216 - N	Cys1-O	3,1	Gly216 - N	Cys24 - O	3,1	Gly216 - N
Cys1-N	2,8	Gly216-O	Cys1-N	3,1	Gly216-O	Cys1-N	2,7	Gly216-O	Cys24-N	2,9	Gly216-O
			Thr2-O	2,9	Gln192-NE2	Thr2-O	2,8	Gln192-NE2			
Lys3-N	3,1	Ser214-O	Lys3-N	3,1	Ser214-O	Lys3-N	3,0	Ser214-O	Lys26-N	3,1	Ser214-O
Lys3-OXT	2,5	Ser195-OG	Lys3-N	2,8	Ser195-OG	Lys3-N	2,8	Ser195-OG	Lys26-N	2,8	Ser195-OG
Lys3-NZ	3,2	Ser190-OG	Lys3-NZ	2,9	Ser190-OG	Lys3-NZ	2,9	Ser190-OG	Lys26-NZ	3,0	Ser190-OG
Lys3-NZ	3,1	Ser190-O	Lys3-NZ	2,9	Ser190-O	Lys3-NZ	2,9	Ser190-O	Lys26-NZ	2,9	Ser190-O
Lys3-NZ	3,2	ASP-189	Lys3-NZ	3,1	Asp189-OD1	Lys3-NZ	3,0	Asp189-OD1	Lys26-NZ	3,1	Asp189-OD1
Lys3-O	3,0	Ser195-N	Lys3-O	2,8	Ser195-N	Lys3-O	2,7	Ser195-N	Lys26-O	2,8	Ser195-N
			Lys3-O	3,2	Asp194-N	Lys3-O	3,2	Asp194-N	Lys26-O	3,3	Asp194-N
Lys3-O	2,8	Gly193-N	Lys3-O	2,5	Gly193-N	Lys3-O	2,6	Gly193-N	Lys26-O	2,7	Gly193-N
						Ser4-N	2,9	Ser195-OG	Ser27-N	3,0	Ser195-OG
			Ile5-N	3,1	Phe41-O	Ile5-N	3,0	Phe41-O	Ile28-N	3,0	Phe41-O
Lys3-OXT	3,0	His57-NE2				Gln8-NE2	2,7	His57-O			
									Ile28-O	2,8	Lys60-N <sup>B</sup>
									Arg33-NH2	3,1	Ser96-O
									Arg33-NH1	3,1	Ser96-O
									Arg33-NH2	3,2	Asn97-O



**Figura 47.** Contatos dos peptídeos ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup>. A tripsina está representada em ciano e os peptídeos em sticks. **A)** *stereo view (cross-eye)* dos contatos polares (verde) entre o ptryp7<sup>orto</sup> (cobre) e a tripsina (ciano). **B)** *stereo view (cross-eye)* dos contatos polares (verde) entre o ptryp7<sup>tetra</sup> (grafite) e a tripsina (ciano).

### 5.4.4 Área acessível ao solvente

A ASA dos peptídeos ptryp7<sup>tetra</sup> e ptryp7<sup>orto</sup> (Figura 48) mostrou que a redução da estrutura aumentou a AE devido a conservação da Lys<sup>3</sup> e seus resíduos adjacentes (Tabela 27). Devido a estrutura do ptryp7 apresentar uma sequência reduzida, a AE individual (Tabela 28) demonstrou uma relação com a ASA total.

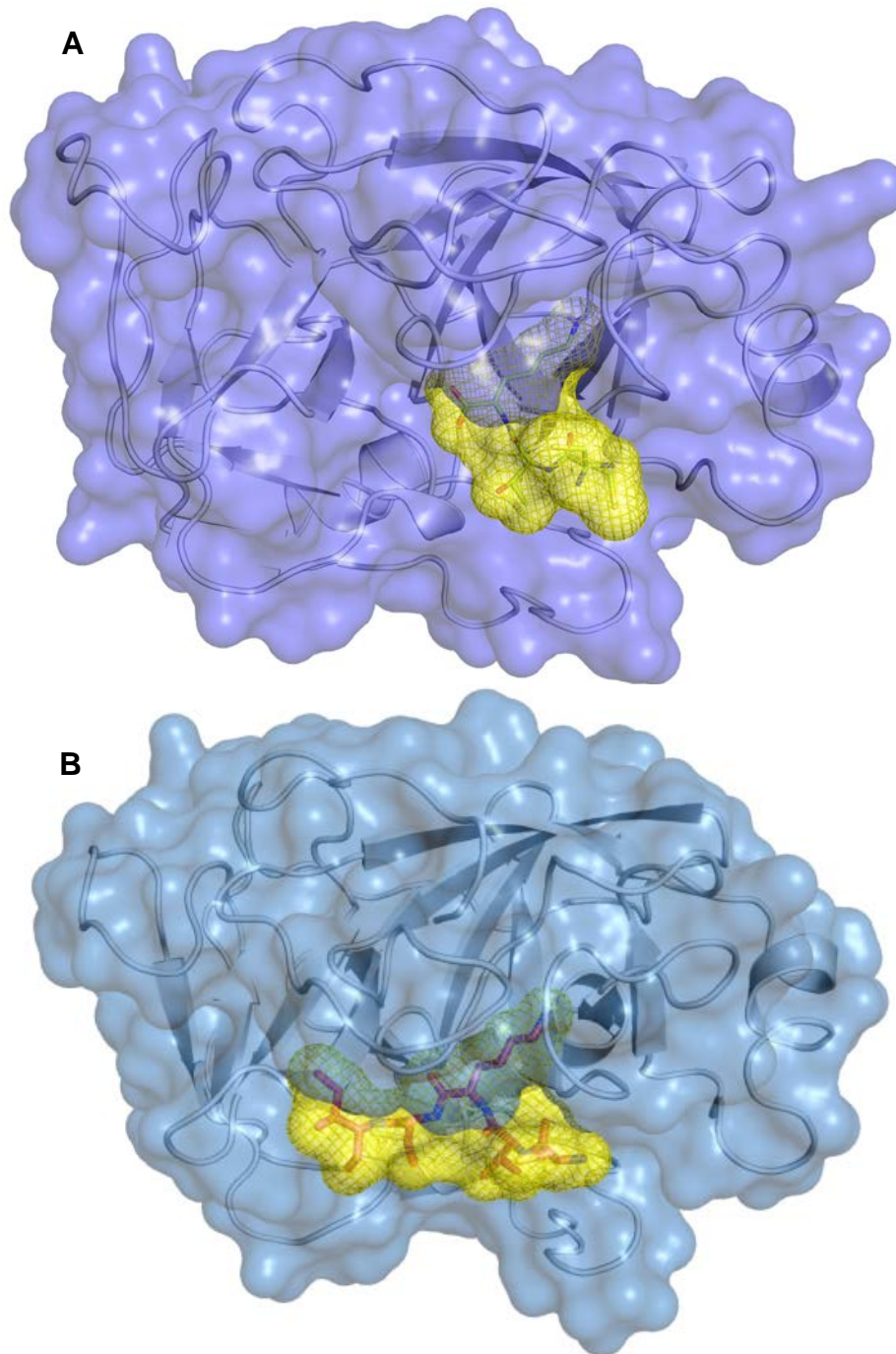
**Tabela 27.** Área acessível ao solvente dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D, ptryp8, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup> e peptídeo do BTCl.

	Grupo espacial	Área acessível total	Área acessível enterrada	Porcentagem enterrada	N° de resíduos na superfície	N° de resíduos na interface
<b>ptryp9-L</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1024,4	572,2	55,9%	9	8
<b>ptryp9-D</b>	<i>P</i> <sub>3221</sub>	1070,3	580,9	54,3%	9	9
<b>ptryp8</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	947,8	550,8	58,1%	8	8
<b>ptryp7<sup>tetra</sup></b>	<i>P</i> <sub>41212</sub>	810,3	559,7	69,1%	5	5
<b>ptryp7<sup>orto</sup></b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	564,8	382,3	67,7%	3	3
<b>Pep-BTCl</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1031,9	521,2	50,5%	9	8

**Tabela 28.** ASA e área enterrada (AE) dos resíduos do ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup>, ptryp9-L.

Resíduo	ptryp7 <sup>tetra</sup>			Resíduo	ptryp7 <sup>orto</sup>			Resíduo	Ptryp9-L		
	ASA	AE	AE%		ASA	AE	AE%		ASA	AE	AE%
CYS1	176,16	76,73	43,56	CYS1	175,22	58,97	33,65	CYS1	109,52	58,22	53,16
THR2	114,92	77,39	67,34	THR2	133,1	80,49	60,47	THR2	64,11	63,61	99,22
LYS3	198,15	198,02	99,93	LYS3	256,49	242,84	94,68	LYS3	202,04	202,04	100
SER4	94,19	64,89	68,89					SER4	43,51	40,34	92,71
ILE5	226,87	142,7	62,90					ILE5	175,45	137,63	78,44
								PRO6	98,39	6,87	6,68
								PRO7	75,06	16,58	22,09
								GLN8	117,44	46,90	39,94
								CYS9	138,87	0,00	0





**Figura 48.** ASA dos peptídeos ptryp7<sup>orto</sup> e ptryp7<sup>tetra</sup>. **A)** ASA (azul) do ptryp7<sup>orto</sup> com 3 resíduos destacados em amarelo em complexo com a tripsina representada em *cartoon*. **B)** ASA (roxa) do ptryp7<sup>tetra</sup> com 5 resíduos destacados em amarelo em complexo com a tripsina representada em *cartoon*.

### 5.4.5 Fatores de temperatura do peptídeo ptryp7

Os fatores de temperatura do ptryp7<sup>tetra</sup> (Tabela 29) e ptryp7<sup>orto</sup> (Tabela 30) demonstraram que a Lys<sup>3</sup> em ambas as estruturas tem o menor fator de temperatura devido estar enterrada no sítio ativo da tripsina, conseqüentemente tendo uma menor mobilidade estrutural devido aos contatos no sítio S1. Os demais resíduos apresentam um valor maior para o fator de estrutura devido à baixa interação com a tripsina e conseqüentemente uma maior mobilidade estrutural.

**Tabela 29.** Fatores de temperatura do ptryp7<sup>tetra</sup>. \*representa os resíduos modelados com ocupância diferente dos demais.

Resíduo	Cys1	Thr2	Lys3	Ser4	Ile5
Átomo / fatores de temperatura individuais	O - 24,65	O - 29,34	O - 22,55		O - 55,76
	N - 37,50	N - 29,18	N - 22,97		N - 40,13
	CA - 35,11	CA - 26,27	CA - 22,62	O - 34,39	C - 45,13
	C - 28,11	C - 26,18	C - 24,09	N - 27,35	CA - 48,95
	CB - 46,59	CB - 28,27	CB - 18,67	CA - 29,71	CB - 47,32
	SG* - 59,87	OG1 - 32,98	CG - 18,52	C - 36,05	CG - 140,57
		CG2 - 31,47	CD - 16,40	CB - 41,24	CG - 246,79
			CE - 16,23	OG - 49,30	CD1 - 38,15*
			NZ - 17,44		
$\bar{X}$ Fator de temperatura	<b>38,64</b>	<b>29,10</b>	<b>19,94</b>	<b>36,34</b>	<b>45,35</b> $\bar{X}=33,87$
Ocupância	<b>1,0 (0,59*)</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00(0,00*)</b>

**Tabela 30.** Fatores de temperatura do ptryp7<sup>orto</sup>. \*representa os resíduos modelados com ocupância diferente dos demais.

Resíduo	Cys1 <sup>A</sup>	Cys1 <sup>B</sup>	Thr2	Lys3
Átomo / fatores de temperatura individuais				O - 26,98
				N - 24,84
	O - 30,18	O - 14,43	O - 24,32	CA - 28,73
	N - 86,18	N - 35,51	N - 35,05	C - 43,20
	CA - 59,81	CA - 60,29	CA - 22,15	CB - 23,34
	C - 48,44	C - 64,21	C - 20,02	CG - 22,48
	CB - 49,42	CB - 73,72	CB - 33,05	CD - 22,77
	SG* - 45,06	SG* - 67,93	OG1 - 30,97	CE - 19,14
			CG2 - 39,27	NZ - 20,46
				OXT - 48,51
$\bar{X}$ Fator de temperatura	<b>53.18</b>	<b>52.68</b>	<b>29.26</b>	<b>28.05</b> $\bar{X}= 36.66$
Ocupância	<b>0.49</b>	<b>0.51</b>	<b>1.00</b>	<b>1,00</b>



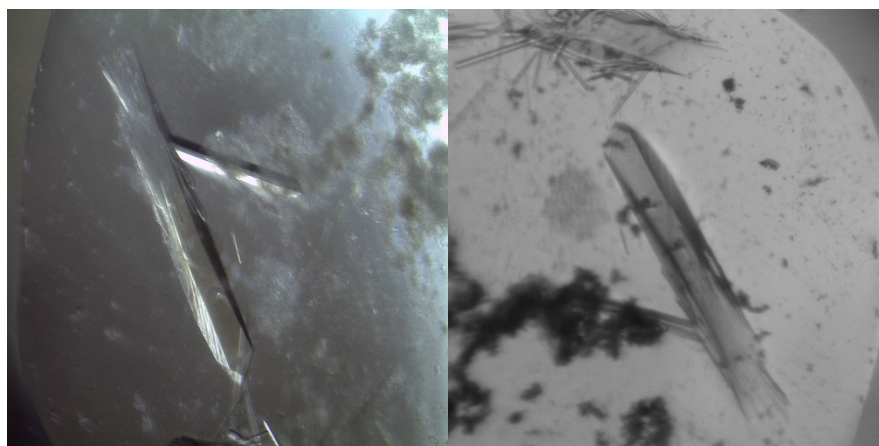
## 5.5 Complexo ptryp6 e tripsina

### 5.5.1 Cristalização do complexo e coleta de dados

O complexo entre o peptídeo ptryp6 e a tripsina seguiu todo o protocolo dos demais peptídeos cristalizados. Das condições testadas, 6 condições se apresentaram promissoras para a cristalização (Tabela 31). As condições foram melhoradas e os cristais do complexo ptryp6 e tripsina obtidos na condição de HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1,5 M (Figura 49).

**Tabela 31.** Condições de cristalização do complexo Ptryp6 com tripsina e quantidade de crioprotetor.

Conjunto	Condição de cristalização	Crioproteção
Ptryp6_1	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; 2% v/v Polietilenoglicol 400; Sulfato de amônio 2,0 M	10% de glicerol
Ptryp6_2	Sulfato de amônio 0,2 M; Cocadilato de sódio 0,1 M pH 6,5; 30% w/v Polietilenoglicol 8000	5% de glicerol
Ptryp6_3	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
Ptryp6_4	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
Ptryp6_5	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
Ptryp6_6	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	
Ptryp6_7	Sulfato de lítio monohidratado 0,2 M; TRIS hidrocloreto 0,1 M pH 8,5; 30 % w/v Polietilenoglicol 4000	15% de glicerol
Ptryp6_8	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1 M	
Ptryp6_9	HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; Sulfato de lítio monohidratado 1,5 M	



**Figura 49.** Imagens do cristal do complexo Ptryp6. Os cristais foram obtidos em HEPES sódio 0,1 M pH 7,5; sulfato de lítio monohidratado 1,5 M.

Os cristais obtidos foram difratados em apenas um  $\lambda$  e coletados apenas no detector Pilatus 2M (Tabela 32). Todos os 9 conjuntos foram coletados demonstraram estar em apenas um grupo espacial, ortorrômbico  $P2_12_12_1$ .

**Tabela 32.** Dados da coleta do complexo Ptryp6 com tripsina.

Conjunto	Comprimento de onda (Å)	Detector	Grupo espacial
Ptryp6_1	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_2	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_3	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_4	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_5	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_6	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_7	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_8	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$
Ptryp6_9	1,20	Pilatus 2M	$P2_12_12_1$

Todos os conjuntos coletados foram processados com o objetivo de visualizar o ptryp6 no sítio da tripsina. O melhor conjunto para a substituição molecular, refinamento e construção do modelo cristalográfico foi escolhido baseado nos valores estatísticos do processamento (Tabela 33).

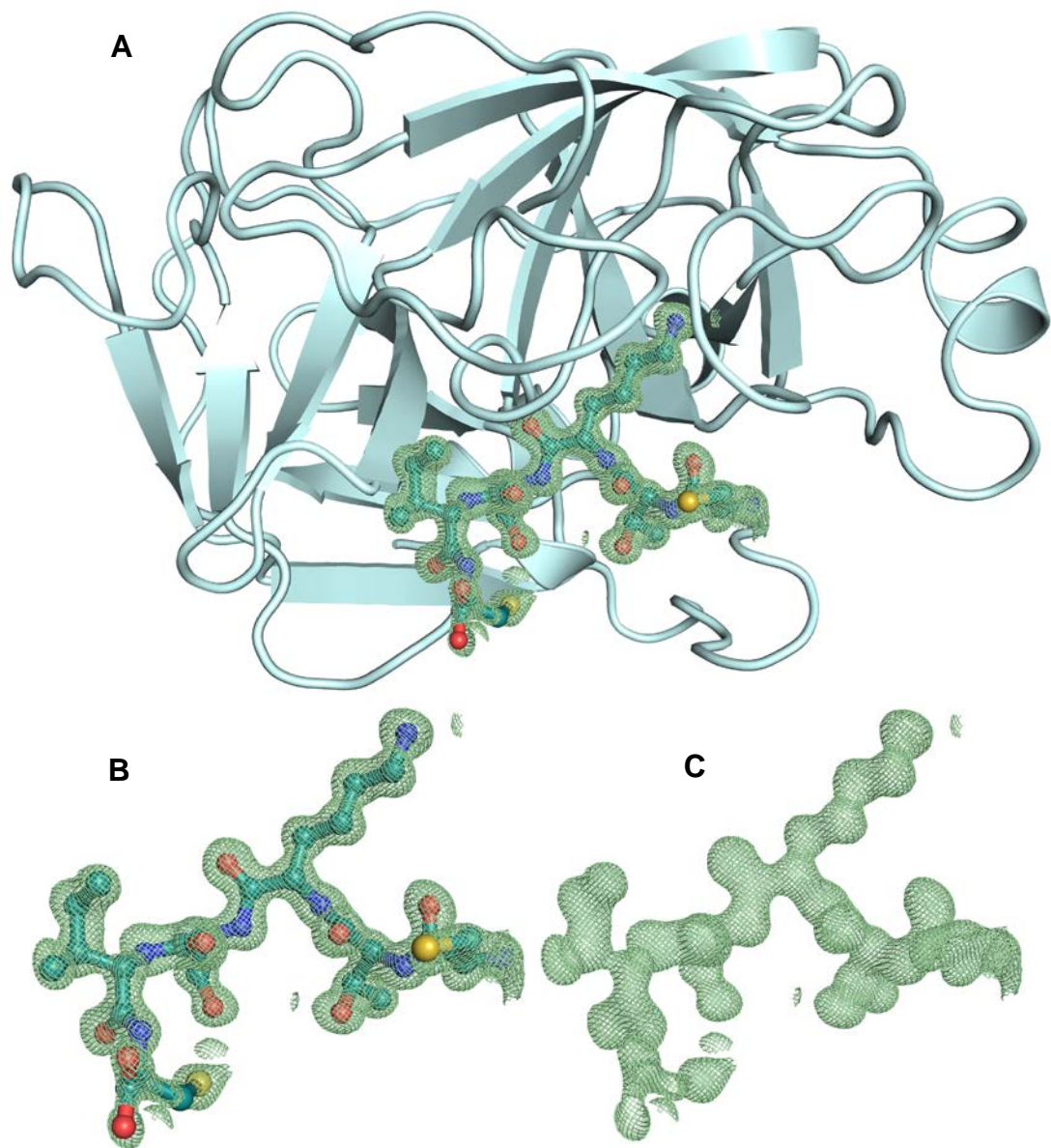
Dentre todos os conjuntos coletados, os conjuntos ptryp6\_3 e ptryp6\_4 apresentaram os melhores valores estatísticos, com resolução de 1,19 Å. O conjunto escolhido para a construção do modelo cristalográfico foi o conjunto ptryp6\_3 devido a suas estatísticas do processamento serem melhores que as dos demais conjuntos. O conjunto ptryp6\_3 apresentou uma completeza total dos dados de 90,2%,  $I/\sigma$  maior que 3 na última camada, com uma multiplicidade maior que 1 e o valor de  $R_{meas} = 4,2\%$  dentro dos valores sugeridos por Wlodawer (Wlodawer, A., *et al.*, 2013).

**Tabela 33.** Estatística do processamento de dados usando o pacote computacional XDS do complexo ptryp6 com a tripsina. Estatísticas totais e estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses. O limite de resolução é mostrado em Å.

Conjunto	Limite de resolução	Reflexões Obs - Únicas	Multiplicidade	Completeza	$I/\sigma$	$R_{meas}$	CC (1/2)
Ptryp6_1	1,50	272417 - 82726 (36477 - 13022)	3,29 (2,80)	98,9% (96,3%)	12,99 (2,03)	7,0% (70,7%)	99,9* (76,7*)
Ptryp6_2	1,38	321104 - 104936 (35775 - 16023)	3,06 (2,23)	98,2% (92,7%)	10,89 (1,54)	7,1% (74,6%)	99,8* (76,3*)
<b>Ptryp6_3</b>	1,19	398433 - 151295 (26333 - 17462)	2,63 (1,51)	90,2% (64,3%)	16,82 (3,12)	4,2% (55,1%)	99,8* (91,1*)
Ptryp6_4	1,19	261061 - 142542 (17637 - 17231)	1,83 (1,02)	86,3% (64,4%)	17,10 (2,10)	2,9% (13,0%)	99,9* (98,2*)
Ptryp6_5	1,22	342525 - 143083 (24850 - 18921)	2,39 (1,31)	93,3% (76,1%)	15,50 (0,92)	3,7% (81,1%)	99,9* (64,6*)
Ptryp6_6	1,22	384910 - 147190 (28214 - 20910)	2,62 (1,35)	96,0% (84,1%)	17,29 (1,09)	3,5% (82,7%)	99,9* (76,7*)
Ptryp6_7	1,41	202181 - 93982 (23140 - 13622)	2,15 (1,70)	94,9% (85,3%)	14,85 (1,68)	4,3% (75,6%)	99,9* (79,6*)
Ptryp6_8	1,27	812924 - 124545 (65375 - 19389)	6,53 (3,37)	98,9% (95,0%)	18,68 (2,00)	6,0% (67,3%)	99,9* (81,1*)
Ptryp6_9	1,31	663521 - 114129 (61224 - 17830)	5,81 (3,43)	99,2% (96,1%)	16,77 (1,97)	6,6% (72,7%)	99,9* (75,2*)

### 5.5.2 Estrutura cristalográfica do complexo ptrp6 e tripsina

A densidade eletrônica do complexo entre o ptryp6 e a tripsina mostrou que o ptryp6 com 6 resíduos (CTKSIC) foi capaz de se ligar com a tripsina mesmo com menos que os demais peptídeos até aqui mostrados (Figura 50). A densidade envolveu totalmente o peptídeo demonstrando sua estrutura (Figura 50 B). Como nos peptídeos (ptryp8 e ptryp7), a densidade mostrou que a ponte de dissulfeto não estava presente na estrutura do ptryp6. O ptryp6 foi modelado e sua tabela cristalográfica mostrada (Tabela 34). Nenhum resíduo do peptídeo ptryp6 mostrado apresenta resíduos na região “desaprovada”, significando que as estruturas modeladas estão estruturalmente corretas.

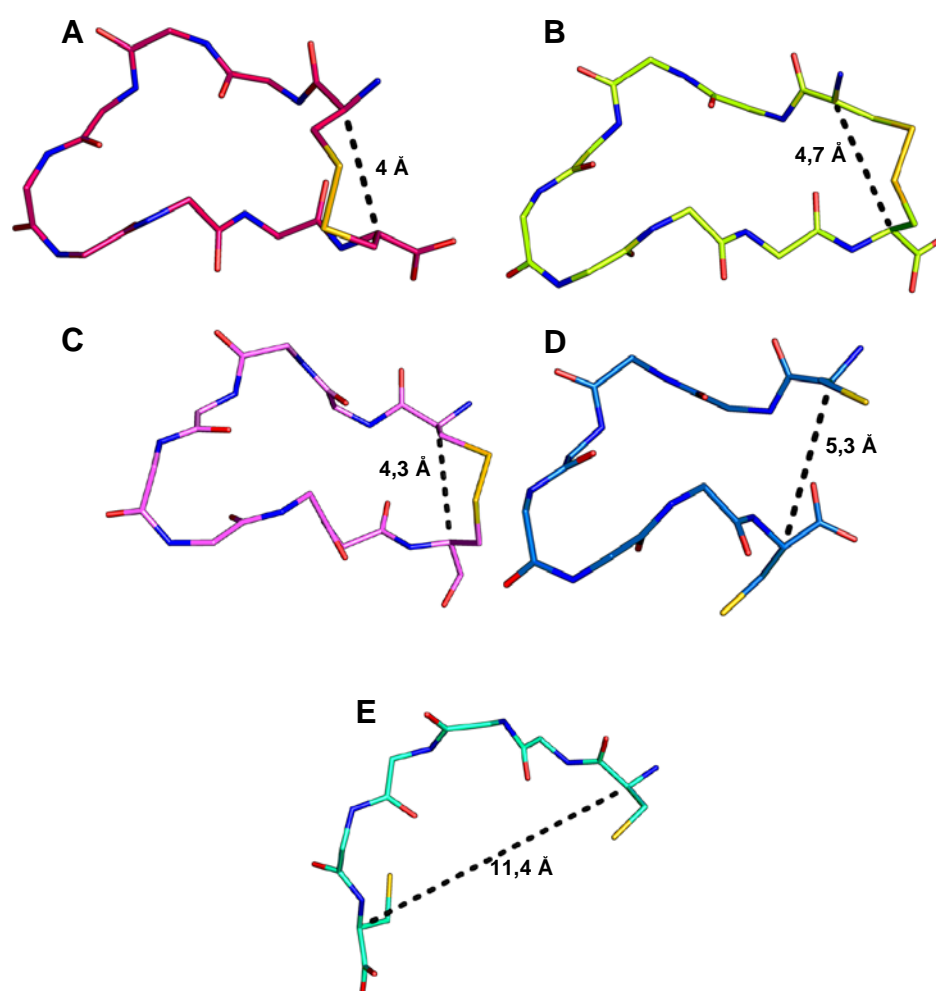


**Figura 50.** Modelo do complexo entre ptryp6 (verde) e tripsina (ciano). A tripsina esta representada em *cartoon*, o peptídeo esta representado em *stick*. Os enxofres das cisteínas estão destacadas em amarelo o *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> esta destacado em verde com um  $\sigma = 1,0$ . **B)** Modelo do ptryp6 (verde) com um *omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um  $\sigma = 1,0$  (verde). **C)** *Omit map* 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> com um contorno de  $\sigma = 0,5$  do ptryp7 em verde.

**Tabela 34.** Estatísticas do refinamento do ptryp6. Estatísticas para a camada de alta resolução são mostradas entre parênteses.

<b>Comprimento de onda (Å)</b>	Ptryp6_3
<b>Limite de resolução</b>	23,33 - 1,19 (1,23 - 1,19)
<b>Grupo espacial</b>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Célula unitária (a, b, c) (Å)</b>	61,58 63,54 68,75
<b>Total de reflexões</b>	398547 (15134)
<b>Reflexões únicas</b>	151328 (7097)
<b>Multiplicidade</b>	2,6 (1,6)
<b>Completeza (%)</b>	97,15 (81,99)
<b>Média I/sigma (I)</b>	16,82 (2,99)
<b>Wilson B-factor</b>	9,94
<b>R-merge</b>	0,0351 (0,488)
<b>R-meas</b>	0,0424 (0,691)
<b>R-pim</b>	0,0233 (0,488)
<b>CC1/2</b>	0,998 (0,881)
<b>CC*</b>	1 (0,968)
<b>Reflexões usadas no refinamento</b>	84758 (7089)
<b>Reflexões usadas no R-free</b>	2000 (167)
<b>R-work</b>	0,144 (0,238)
<b>R-free</b>	0,158 (0,240)
<b>CC(work)</b>	0,977 (0,919)
<b>CC(free)</b>	0,971 (0,906)
<b>Número de átomos sem hidrogênio</b>	2090
<b>macromoléculas</b>	1702
<b>Ligantes</b>	11
<b>Solvente</b>	377
<b>Resíduos de proteína</b>	229
<b>RMS(bonds)</b>	0,009
<b>RMS(angles)</b>	1,09
<b>Ramachandran favored (%)</b>	98,22
<b>Ramachandran allowed (%)</b>	1,78
<b>Ramachandran outliers (%)</b>	0,00
<b>Rotamer outliers (%)</b>	0,00
<b>Clashscore</b>	0,29
<b>Média B-factor</b>	15,44
<b>macromoléculas</b>	12,47
<b>ligantes</b>	17,39
<b>Solvente</b>	28,80
<b>Número de grupos de TLS</b>	5
<b>PDB</b>	6EAX

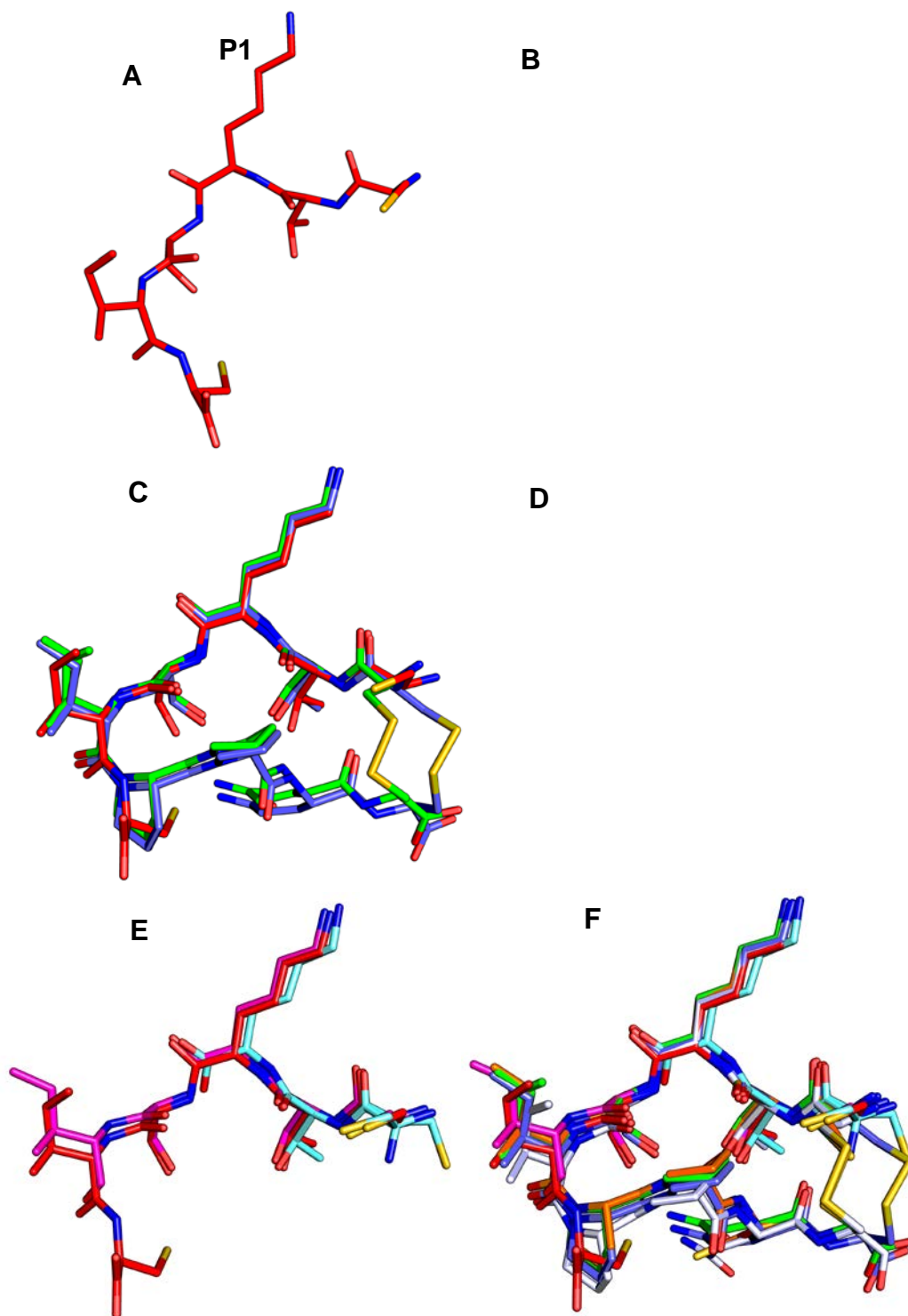
Pode se notar uma maior distância entre os C $\alpha$  dos resíduos de Cys do peptídeo ptryp6 em relação aos demais peptídeos (ptryp9-L e D, ptryp8 e BTCl) (Figura 51). A distância entre os C $\alpha$  dos resíduos de Cys dos peptídeos sugere que quanto maior a distância maior a linearidade do peptídeo e conseqüentemente menor estabilidade. Pode se notar uma semelhança entre os peptídeos cíclicos e os que não mostraram a ligação de dissulfeto. A distância entre os C $\alpha$  dos resíduos de Cys demonstra o quão importante é essa ligação para conferir estabilidade e a conservação de atividade inibitória.



**Figura 51.** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas dos peptídeos derivados do BTCl e do BTCl estão representadas apenas as cadeias principais. **A)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp9-L. **B)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp9-D. **C)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do BTCl. **D)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp8. **E)** Distância entre os C $\alpha$  das cisteínas do ptryp6.

Esse resultado nos informa que quanto maior a diminuição da sequência consenso maior a distancia entre os C $\alpha$  dos resíduos de Cys que configuram estabilidade para a estrutura. Como nas demais estruturas a linearização do ptryp6 foi observada pela densidade eletrônica (Figura 51). Essa linearidade apoia os dados mostrados nesse estudo, onde se fortalece a hipótese de que a inibição das proteases é dependente de estruturas minimamente estabilizadas por uma ponte de dissulfeto.

Mesmo o ptryp6 não apresentando atividade ele reconhece o sítio S1 da tripsina e mantendo a sua conformação similar aos demais peptídeos derivados do BTCl (Figura 52). Essa similaridade da posição P1 demonstra o grau de seletividade do sítio da tripsina reconhecendo o resíduo de Lys<sup>3</sup> (Figura 52). As demais características dos BBIs não foram observadas no ptryp6 devido a sua sequência apresentar apenas 6 resíduos.



**Figura 52.** Sobreposição dos peptídeos derivados do BTC1. **A)** Modelo do ptryp6. A distância entre os C $\alpha$  estão destacadas em amarelo. **B)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com o BTC1 (branco). **C)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com os peptídeos ptryp-L (verde) e ptryp9-D (azul). **D)** sobreposição do ptryp6 (vermelho) com o ptryp8 (laranja). **E)** sobreposição do ptryp6 com os peptídeos ptryp7ortho (ciano) e ptryp7<sup>tetra</sup> (roxo). **F)** sobreposição de todos os peptídeos derivados do BTC1.



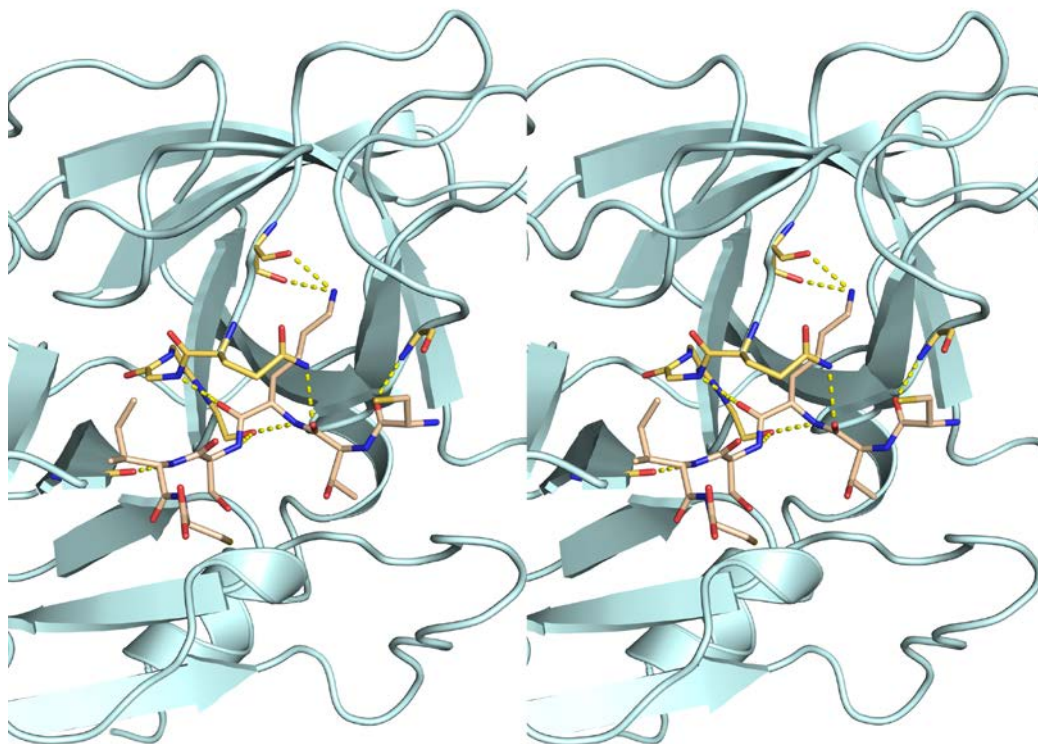
### 5.5.3 Análise da interface do complexo ptryp6 e a tripsina

A análise da interface mostrou que o ptryp6 perdeu vários contatos importantes com a tripsina (Tabela 35). A perda dos contatos do ptryp6 com a interface da tripsina, somado ao fato de que a estrutura não apresenta a ponte de dissulfeto, linearidade da estrutura, são fatores que fornecem justificam a perda total de atividade inibitória apresentada pelo ptryp6 (Figura 20).

Pode se notar que o de nitrogênio<sup>7</sup> da Lys<sup>3</sup> perdeu o contato de especificidade no bolsão S1 com o átomo de oxigênio<sup>51</sup> da Asp<sup>189</sup>. A perda de uma interação altamente específica mostra que a redução da estrutura inicialmente com 9 resíduos para 6 é totalmente desprovida de atividade inibitória.

**Tabela 35.** Contatos polares de até 3.2 Å do ptryp6, ptryp9-L e BTCI. As lacunas representam os contatos que não estão presente em alguma estrutura. \*As distâncias estão demonstradas em Å. <sup>B</sup>resíduos em dupla conformação na estrutura do BTCI

Ptryp6	Dis*	Tripsina	Ptryp9 - L	Dis*	Tripsina	BTCI	Dis*	Tripsina
						Cys22 - O	2,8	Ser217 - OG
Cys1 - O	3,0	Gly216 - N	Cys1 - O	3,1	Gly216 - N	Cys24 - O	3,1	Gly216 - N
			Cys1 - N	2,7	Gly216 - O	Cys24 - N	2,9	Gly216 - O
Thr2 - O	2,9	Gln192 - NE2	Thr2 - O	2,8	Gln192 - NE2			
			Lys3 - N	3,0	Ser214 - O	Lys26 - N	3,1	Ser214 - O
Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys3 - N	2,8	Ser195 - OG	Lys26 - N	2,8	Ser195 - OG
Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - OG	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - OG	Lys26 - NZ	3,0	Ser190 - OG
Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - O	Lys3 - NZ	2,9	Ser190 - O	Lys26 - NZ	2,9	Ser190 - O
			Lys3 - NZ	3,0	Asp189 - OD1	Lys26 - NZ	3,1	Asp189 - OD1
Lys3 - O	2,9	Ser195 - N	Lys3 - O	2,7	Ser195 - N	Lys26 - O	2,8	Ser195 - N
			Lys3 - O	3,2	Asp194 - N	Lys26 - O	3,3	Asp194 - N
Lys3 - O	2,7	Gly193 - N	Lys3 - O	2,6	Gly193 - N	Lys26 - O	2,7	Gly193 - N
Ser4 - N	3,0	Ser195 - OG	Ser4 - N	2,9	Ser195 - OG	Ser27 - N	3,0	Ser195 - OG
Ile5 - N	3,1	Phe41 - O	Ile5 - N	3,0	Phe41 - O	Ile28 - N	3,0	Phe41 - O
			Gln8 - NE2	2,7	His57 - O			
						Ile28 - O	2,8	Lys60 - N <sup>B</sup>
						Arg33 - NH2	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH1	3,1	Ser96 - O
						Arg33 - NH2	3,2	Asn97 - O



**Figura 53.** *Stereo View (Cross eye)* dos contatos polares do ptryp6. A tripsina está representada em *cartoon*. As cadeias laterais e o ptryp6 estão representados em *sticks*.

#### 5.5.4 Área acessível ao solvente

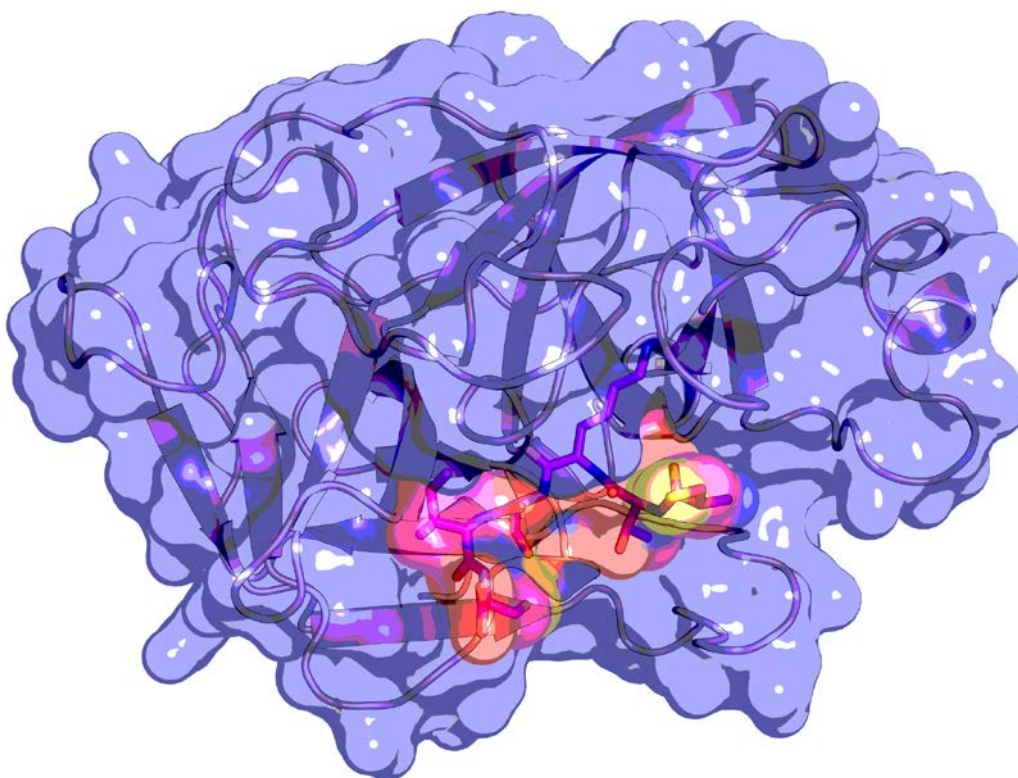
A ASA do ptryp6 apresetou um valor de 925,3 Å<sup>2</sup> devido aos 6 resíduos presentes na estrutura do peptídeo (Tabela 36). A AE individual mostrou uma correlação com a ASA total (Tabela37). A estrutura do ptryp6 mostrou estar mais de 60% enterrada devido à presença da Lys<sup>3</sup> que reconhece o bolsão de especificidade da tripsina (Figura 54).

**Tabela 36.** ASA dos peptídeos ptryp9-L, ptryp9-D, ptryp8, ptryp7<sup>tetra</sup>, ptryp7<sup>orto</sup>, peptídeo do BTCl e ptryp6.

	<b>Grupo espacial</b>	<b>Área acessível total</b>	<b>Área acessível enterrada</b>	<b>Porcentagem enterrada</b>	<b>N de resíduos</b>
<b>ptryp9-L</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1024,4	572,2	55,9%	9
<b>ptryp -D</b>	<i>P</i> <sub>3221</sub>	1070,3	580,9	54,3%	9
<b>ptryp8</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	947,8	550,8	58,1%	8
<b>ptryp7</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	810,3	559,7	69,1%	5
<b>ptryp7</b>	<i>P</i> <sub>412121</sub>	564,8	382,3	67,7%	5
<b>ptryp6</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	925,3	562,9	60,8%	6
<b>Pep-BTCl</b>	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1031,9	521,2	50,5%	9

**Tabela 37.** ASA e AE dos resíduos do ptryp6.

<b>Ptryp6</b>			
<b>Resíduo</b>	<b>ASA</b>	<b>AE</b>	<b>AE%</b>
CYS1	175,51	78,26	44,59
THR2	123,14	80,53	65,40
LYS3	202,90	202,33	99,72
SER4	76,20	63,74	83,65
ILE5	172,39	134,75	78,17
CYS6	172,65	0,00	0,00



**Figura 54.** ASA do ptryp6 em complexo com a tripsina. A ASA da trpsina (azul) está complexada com ptryp6 com 6 resíduos representada em *sticks* envolvida por esferas transparentes.

### 5.5.5 Fatores de temperatura do peptídeo ptryp6

Os fatores de temperatura do ptryp6 demonstrou uma correlação com os resultados da ASA. A mobilidade dos átomos é dependente da estabilidade estrutural desses resíduos, devido à sequência reduzida do ptryp6 na qual a Lys<sup>3</sup> reconhece o bolsão e conseqüentemente um baixo valor do fator de temperatura é notado e acompanhado pelos resíduos adjacentes a Lys<sup>3</sup>. Como nos demais peptídeos mostrados, o ptryp6 apresentou os menores valores para o fator de temperatura para os resídos Thr<sup>2</sup>, Lys<sup>3</sup> e Ser<sup>4</sup> devido ao fato que esses resíduos fazem os contatos com a interface com a tripsina e tem a menor vibração dos átomos.

De acordo com Pavel, estruturas com a resolução como a do ptryp6 apresentam valores para a média do fator de temperatura sendo 16,44 Å<sup>2</sup>. Os

valores do ptryp6 estão dentro dos valores sugeridos por Pavel para os fatores de temperatura (Pavel Afonine,2003).

**Tabela 38.** Fatores de temperatura e ocupância dos átomos do peptídeo ptryp6.

Resíduo	Cys1	Thr2	Lys3	Ser4	Ile5	Cys6	
<b>Átomo / fatores de temperatura individuais</b>	O - 15,75	O - 13,23	O - 11,54		O - 20,45	O - 24,72	
	N - 22,67	N - 14,57	N - 12,12	O - 16,28	N - 17,28	N - 22,12	
	CA - 22,43	CA - 13,39	CA - 11,69	N - 12,88	C - 18,57	CA - 24,48	
	C - 17,02	C - 12,29	C - 11,87	CA - 14,03	CA - 20,32	C - 24,90	
	CB - 27,48	CB - 14,75	CB - 11,82	C - 15,68	CB - 18,79	CB - 26,48	
	SG - 32,31	OG1 - 16,61	CG - 11,00	CB - 15,68	CG1 - 19,67	CG - 27,98	
		CG2 - 15,81	CD - 11,13	OG - 18,12	CG2 - 19,37	CD - 25,74	
			CE - 11,04		CD1 - 20,51		
			NZ - 11,33				
<b><math>\bar{X}</math> Fator de temperatura</b>	<b>22,94</b>	<b>14,38</b>	<b>11,50</b>	<b>15,45</b>	<b>19,37</b>	<b>25,20</b>	<b><math>\bar{X} = 18,14</math></b>
<b>Ocupância</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	

## 6. Conclusão

Inibidores de serino protease derivados de fontes naturais têm considerável importância terapêutica e biotecnológica. Estes inibidores são amplamente estudados para obter uma visão das possibilidades de engenharia de proteínas, levando-se em consideração suas estabilidades térmicas e a especificidade da inibição na catálise enzimática.

As estruturas tridimensionais dos inibidores de serino protease derivados de um inibidor natural foram resolvidas por cristalografia e depositadas no PDB. As estruturas mostram que alterações sutis, como redução na sequência desses inibidores são capazes de alterar a sua função biológica específica e que a estrutura básica desses inibidores derivados de BBI é altamente conservada e estável por restrições difíceis de serem superadas.

A resolução das estruturas e a construção dos modelos cristalográficos de alta resolução dos peptídeos derivados de BTCl mostraram em que todas as estruturas a lisina estavam presente e interagindo por meio de ligações de hidrogênio no sítio S1 da tripsina.

Em geral, as proteínas BBI, incluindo BTCl, apresentam um *loop* inibitório com 9 resíduos. Uma análise bioquímica e estrutural mostrou que a perda de contatos potenciais com a enzima alvo resulta em uma atividade reduzida ou nenhuma atividade. As estruturas dos peptídeos derivados do BTCl mostram que a redução do *loop* inibitório que interage com a tripsina de 9 resíduos para 8, 7 e 6 resíduos acarretou na perda ou diminuição da atividade contra tripsina.

O peptídeo ptryp9 cíclico originário do sítio reativo do BTCl manteve a estrutura e atividade semelhantes ao BTCl, o mesmo não ocorreu em relação aos demais peptídeos testados. Isso nos permite a construção única de um potente inibidor de proteases derivado de um inibidor de uma proteína natural, que são facilmente sintetizados com apenas 9 resíduos. A potência desse curto *loop* inibitório é surpreendente, ilustrando uma alternativa para o melhoramento natural de proteínas inteiras. Os estudos estruturais dos peptídeos cíclicos derivados do

BTCI mostra a relevância de explorar novas construções baseando-se nos conhecimentos acumulados sobre peptídeos naturais.

## 7. Referências

- (1) A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, Pt 4, J. Appl. Crystallogr. 40 (2007) 658 e 674.
- (2) Almonte AG, Sweatt JD. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. Brain Res. 2011;1407:107-122.
- (3) Ando, S.; Yasutake, A.; Waki, M.; Nishino, N.; Kato, T.; Izumiya, N. Biochim Biophys Acta 1987, 916,527-531.39.
- (4) Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(4):a007161.
- (5) Barrett, A. J., Tolle, D. P. and Rawlings, N. D. (2003) Managing peptidases in the genomic era. Biol. Chem. 384, 873 - 882.
- (6) Ben M Dunn, Anatomy and pathology of HIV-1 peptidase, Essays In Biochemistry Oct 01, 2002,38113-127.
- (7) Beynon, R.J. & Bond, J.S. (1989) Proteolytic Enzymes: A Practical Approach, IRL Press, Oxford.
- (8) Birk Y (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans, Int. J. Pept. Protein Res., 25: 113-131.
- (9) Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S. Biochem J 1963, 87, 281-284.
- (10) Bode W, Huber R (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem., 204: 433-451.
- (11) Bode, W., and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem. 204, 433-451
- (12) Bowman, D. E. Proc Soc Exp Biol Med 1946, 63, 547-550.
- (13) Brauer AB, Nievo M, McBide JD, Leatherbarrow RJ. The structure basis of a conserved P2 threonine in canonical serine proteinase inhibitors. J Biomol Struct Dyn 2003, 20: 645-656.
- (14) Brauer, A. B. E.; Kelly, G.; McBride, J. D.; Cooke, R. M.; Matthews, S. J.; Leatherbarrow, R. J. J Mol Biol 2001, 306, 799-807.
- (15) C. L. Stevens and M. A. Lauffer, Biochemistry, 1965, 4, 31–37.
- (16) Chen P, Rose J, Love R, Wei CH, Wang BC (1992). Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. J. Biol. Chem., 267: 1990-1994.
- (17) Christeller JT (2005). Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. FEBS Journal, 272: 5710–5722.
- (18) Christeller, J. T. (2005) Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. FEBS J. 272, 5710-5722
- (19) Clemente, A., Domoney, C., del Carmen Arques, M. & del Carmen Marín-Manzano, M. *Bowman-Birk inhibitors from legumes: utilisation in disease prevention and therapy*. (INTECH Open Access Publisher, 2013).
- (20) Craig DB, Dombkowski AA. Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins. BMC Bioinformatics. 2013;14:346. Published 2013 Dec 1. doi:10.1186/1471-2105-14-346.
- (21) D. J. Craik, N. L. Daly, T. Bond, C. Waine, J. Mol. Biol. 1999, 294, 1327-1336.
- (22) da Cunha Morales Álvares A, Schwartz EF, Amaral NO, et al. Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides. *Molecules*. 2014;19(11):17536-58.
- (23) David L. Nelson e Michael M. Cox. 6 Edição. Artmed 2014.
- (24) David M. Blow, Structure and Mechanism of Chymotrypsin Accounts of Chemical Research, Vol. 9, (1976), 145 e 152.



- (25) De Leo F, Ceci LR, Jouanin L, Gallerani R (2001). Analysis of mustard trypsin inhibitor-2 gene expression in response to developmental or environmental induction. *Planta* 212: 710-717.
- (26) DiPietro CM, Liener IE, Soybean Protease Inhibitors in Foods, *J Food Sci.* 1989.
- (27) Dittmann, K. H.; Gueven, N.; Mayer, C.; Rodemann, H. P. *Protein Eng* 2001, 14,157–160.
- (28) Domingo, G. J.; Leatherbarrow, R. J.; Freeman, N.; Patel, S.; Weir, M. *Int J Pept Protein Res* 1995, 46, 79-87.
- (29) Donal Voet e Judith G. Voet. 4 Edição. Artmed 2013.
- (30) Dunaevskii YE, Gladysheva IP, Pavlukova EB, Beliakova GA, Gladysheva DP, Papisova AI, Larionova NI, Belozersky MA (1997). The anionic protease inhibitor BBWI-I from buckwheat seeds. Kinetic properties and possible biological role. *Physiol. Plant.* 100: 483-488.
- (31) E. Krissinel and K. Henrick (2007). 'Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.'. *J. Mol. Biol.* 372, 774-797.
- (32) Eckelkamp C, Ehmann B, Schopfer P (1993). Wound-induced systemic accumulation of a transcript coding for a Bowman-Birk trypsin inhibitor-related protein in maize (*Zea mays* L.) seedlings, *FEBS Lett.* 323: 73-76.
- (33) Engh RA, Huber R. Structure quality and target parameters. In: Rossmann MG, Arnold E, editors. *International Tables for Crystallography.* F. Kluwer; Dordrecht: 2001. pp. 382–392.
- (34) *Enzyme Nomenclature.* San Diego: Academic Press. 1992.
- (35) Farady CJ, Craik CS. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBiochem.* 2010;11:2341-2346.
- (36) Freitas S.M., *et. al.,.* *FEBS Lett.* Jun 9;409(2):121-7, 1997.
- (37) G. J. Kleywegt Validation of protein crystal structures (Topical review) *Acta Cryst., D56:* 249-265, 2000.
- (38) G. J. Kleywegt, M. R. Harris, J. Zou, T. C. Taylor, A. Wählby, and T. A. Jones. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Cryst., D60:*2240–2249, 2004.
- (39) G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin.REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst. D67:*355–367, 2011.
- (40) G.D. Brand, D.A.T. Pires, J.R. Furtado Jr., A. Cooper, S.M. Freitas, C. Bloch Jr., Oligomerization affects the kinetics and thermodynamics of the interaction of a BowmanBirk inhibitor with proteases, *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2017)
- (41) Gariani, T.; Leatherbarrow, R. J. *J Pept Res* 1997, 49,467-475
- (42) Gladysheva IP, Zamolodchikova TS, Sokolova EA, Larionova NI (1999). Interaction between duodenase, a proteinase with dual specificity, and soybean inhibitors of Bowman-Birk and Kunitz type. *Biochemistry* 64: 1244-1249.
- (43) Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie.* 2010;92(11):1546-67.
- (44) Green, T. R.; Ryan, A. C. *Science* 1972, 175, 776-777.
- (45) Guy S Salvesen, Caspases and apoptosis, *Essays In Biochemistry,* Oct 01, 2002,389-19.
- (46) H. Tsukada, D.M. Blow, Structure of  $\alpha$ -chymotrypsin refined at 1.68 Å resolution, *Journal of Molecular Biology,* Volume 184, Issue 4, 20 August 1985, Pages 703-711.
- (47) H.C.. Fachetti, K. Mizuta, M.M. Ventura, Thermodynamics of the Association of Trypsin with the Black-Eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin inhibitor, *An. Acad. Bras. Cienc.* 56 (1984) 311-317.
- (48) Haq SK, Atif SM, Khan RH (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 43(1): 145-159.
- (49) Hartley, B. S. 1964 *Nature, Lond.* 201, 1284.
- (50) Heitz, A, Jean-François Hernandez, Jean Gagnon, Thai Trinh Hong, T. Trần Châu Pham, Tuyet Mai Nguyen, Dung Le-Nguyen, and, and Laurent Chiche. Solution Structure of

- the Squash Trypsin Inhibitor MCoTI-II. A New Family for Cyclic Knottins, *Biochemistry* 2001 40 (27), 7973-7983.
- (51) Hernandez, J. F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T. M., Andrieu, J. P., Heitz, A., Trinh Hong, T., Pham, T. T., and Le Nguyen, D. (2000) Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* 39, 5722-5730
- (52) Hernandez, J.F., Jean Gagnon, Laurent Chiche, Tuyet Mai Nguyen, Jean-Pierre Andrieu, Annie Heitz, Thai Trinh Hong, T. Trần Châu Pham, and Dung Le Nguyen. Squash Trypsin Inhibitors from *Momordica cochinchinensis* Exhibit an Atypical Macrocyclic Structure. *Biochemistry* 2000 39 (19), 5722-5730.
- (53) Honda, D. E., Martins, J. B., Ventura, M. M., Eyrilmez, S. M., Lepšík, M. , Hobza, P. , Pecina, A. and Freitas, S. M. (2018), Interface Interactions of the Bowman–Birk Inhibitor BTC1 in a Ternary Complex with Trypsin and Chymotrypsin Evaluated by Semiempirical Quantum Mechanical Calculations. *Eur. J. Org. Chem.*, 2018: 5203-5211.
- (54) Huber, R. & Bode, W. (1978). *Acc. Chem. Res.* 11, 114-122.
- (55) Huber, R., Kukla, D., Ruehlmann, A., Epp, O. & Formanek, H. (1970), *Naturwissenschaften*, 57, 389-392.
- (56) Huma Habib e Khalid Majid Fazili. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (3), pp. 068-085, August 2007.
- (57) I.W. Davis, A. Leaver-Fay, V.B. Chen, J.N. Block, G.J. Kapral, X. Wang, L.W. Murray, W.B. Arendall 3rd, J. Snoeyink, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids*, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W375 e W383.
- (58) Ikenaka, T.; Norioka, S., In *Proteinase Inhibitors*; Barrett, A. J., Salvesen, G. S., Eds.; Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, 2.
- (59) Jancarik, J. and Kim, S. (1991), Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, 24: 409-411.
- (60) Jaskolski M, Gilski M, Dauter Z, Wlodawer A. Stereochemical restraints revisited: how accurate are refinement targets and how much should protein structures be allowed to deviate from them. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007 May; 63(Pt 5):611-20.
- (61) Jaulent, A. M.; McBride, J. D.; Leatherbarrow, R. J. In *Peptides: The Wave of the Future. Proceedings of the Second International and Seventeenth American Peptide Symposium*; Lebl, M., Houghten, R. A., Eds.; American Peptide Society, San Diego, California, USA, 2001, 547–548.
- (62) Jesse Rodriguez, Nitin Gupta, Richard D. Smit e Pavel A. Pevzner, *J. Proteome Res.*, 2008, 7(01), 300-305.
- (63) Jianxu Li, Cheng Zhang, Xueqing Xu, Jie Wang, Haining Yu, Ren Lai, and Weimin Gong. Trypsin inhibitory *loop* is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *The FASEB Journal* 2007 21:10, 2466-2473.
- (64) Joanitti *et al.*, Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *FEBS Lett.* Dez 293, 73-81, 2010.
- (65) João Alexandre R. G. Barbosa, Luciano P. Silva, Rozeni C. L. Teles, Gisele F. Esteves, Ricardo B. Azevedo, Manuel M. Ventura, and Sonia M. de Freitas Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with b-Trypsin at 1.55Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteases, *Biophysical Journal* Volume 92 March 2007 1638-1650.
- (66) Kennedy, A. R. *Pharmacology & Therapeutics* 1998, 78, 167-209
- (67) Khan AR, Khazanovich-Bernstein N, Bergmann EM, James MN. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):10968-75.
- (68) Khan MS, *et al.* Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. *J Amino Acids.* 2011;2011:606797.
- (69) Koiwa K, Shade RE, Zhu-Salzman K, Subramanian L, Murdock LL, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM (1998). Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant J.*, 14: 371-379.

- (70) Konarev, A. V.; Anisimova, I. N.; Gavrilova, V. A.; Vachrusheva, T. E.; Konechnaya, G. Y.; Lewis, M.; Shewry, P. R. *Phytochemistry* 2002, 59, 279-291.
- (71) Korsinczky, M. L., Schirra, H. J., Rosengren, K. J., West, J., Condie, B. A., Otvos, L., Anderson, M. A., and Craik, D. J. (2001) Solution structures by <sup>1</sup>H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* 311, 579-591.
- (72) Korsinczky, M. L.; Schirra, H. J.; Rosengren, K. J.; West, J.; Condie, B. A.; Otvos, L.; Anderson, M. A.; Craik, D. J. *J Mol Biol* 2001, 311, 579–591.
- (73) Korsinczky, M.L, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Curr. Protein Pept. Sci.* 2004, 5, 351-364
- (74) Krattiger AF (1997). Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs*, 2: 42.
- (75) Kunitz, M. e Northrop, J. H. 1935 *J. gen. Physiol.* 18, 433.
- (76) Kunitz, M., & J. H. Northrop, 1935, Crystalline Chymo-Trypsin and Chymo-Trypsinogen : I. Isolation, Crystallization, and General Properties of a New Proteolytic Enzyme and Its Precursor: *J Gen Physiol*, v. 18, p. 433-58.
- (77) Kunitz, M., *Science*, 1945, 101, 668;. *Gen. Physiol.*, 1945, 29, 149.
- (78) L. Morhy, M.M. Ventura, *An. Acad. Brasil. Ciénc.*59 (1987) 71- 81
- (79) L.P. Silva, R.B. Azevedo, P.C. Morais, M.M. Ventura, S.M. Freitas, Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches., *Proteins*. 61 (2005) 642-8. doi:10.1002/prot.20646.
- (80) Laskowski Jr, M., M. A. Qasim, & M. L. Stephen, 2000, Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteases, *in* C. Kleanthous, B. D. Hames, and D. M. Glover, eds., *Protein-Protein recognition*: New York, Oxford University Press, p. 228-79.
- (81) Laskowski, M., Jr., & I. Kato, 1980, Protein inhibitors of proteases: *Annu Rev Biochem*, v. 49, p. 593-626.
- (82) Lawrence PK, Koundal KR (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.*, 5(1): 93-109.
- (83) Lee CF, Lin JY (1995). Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the melon *Cucumis melo*. *J. Biochem.* 118(1): 18-22.
- (84) Lee, B. and Richards, F.M. (1971) *J. Mol. Biol.* , 55, 379-400..
- (85) Li, Y. L.; Huang, Q. C.; Zhang, S. W.; Liu, S. P.; Chi, C. W.; Tang, Y. Q. *J. Biochemistry* 1994, 116, 18–25.
- (86) Lin G D, Bode W, Huber R, Chi CW, Engl RA (1993). The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *Eur. J. Biochem.*, 212: 549-555.
- (87) Lin YH, Li HT, Huang YC, Hsieh YC, Guan HH, Liu MY, Chang T, Wang AHJ, Chen CJ (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rice Bowman-Birk inhibitor from *Oryza sativa*. *Acta Cryst.* F62: 522-524.
- (88) Look, M. P. & Foekens, J. A. Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 107,150–159 (1999).
- (89) Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008;283:30433-30437.
- (90) Losso, JN. The Biochemical and Functional Food Properties of the Bowman-Birk Inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:1, pages 94-118. (2008).
- (91) Luciano Paulino da Silva, Jose Roberto S.A. Leite, Carlos Bloch Jr. and Sonia Maria de Freitas, Stability Of A Black Eyed Pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor (BTCI), *Protein & Peptide Letters*, Vol8, issue 1, pages 33-38, 2001.
- (92) Luckett, S.; Garcia, R. S.; Barker, J. J.; Konarev, A. V.; Shewry, P. R.; Clarke, A. R.; Brady, R. L. *J Mol Biol* 1999, 290, 525-533.
- (93) Luyao Zhang, Xiaoling Chen, Yue Wu, Mei Zhou, Chengbang Ma, Xinping Xi, Tianbao Chen, Brian Walker, Chris Shaw & Lei Wang. A Bowman-Birk type chymotrypsin inhibitor peptide

- from the amphibian, *Hylarana erythraea*. Scientific Reports volume 8, Article number: 5851 (2018)
- (94) M B. McFerrin, Edward H. Snell, The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images, *J. Appl. Cryst.* (2002). 35, 538 e 545.
- (95) M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin and K. S. Wilson. *Acta Cryst.* (2011). D67, 235-242.
- (96) M. Matheus Ventura and J. Bastos Aragão, *An. Acad. Brasil. Ciênc.* (1978) 50 (4), 587-596
- (97) M. Sônia de F, Manuel M. Ventura, *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 68 (1996) 165-174.
- (98) M.K. Fachetti HCS, Ventura MM, , Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor., *An. Acad. Bras. Cienc.* 56 (1984) 311-317.
- (99) M.M. Ventura, J. Xavier Filho, *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 38 (1966) 553-566.
- (100) M.M. Ventura, J.B. Aragão, *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 50 (1978) 587-596.
- (101) M.M. Ventura, K. Mizuta, H. Ikemoto, Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution - a study by light scattering, *An. Acad. Bras. Cienc.* 53 (1981) 195-201.
- (102) Maeder, D. L.; Sunde, M.; Botes, D. P. *Int J Pept Protein Res* 1992, 40, 97–102.
- (103) McBride, J. D., Brauer, A. B.; Nievo, M.; Leatherbarrow, R. J. *J Mol Biol* 1998, 282, 447-458.
- (104) McBride, J. D., e Leatherbarrow, R. J. *Curr. Med. Chem.* 8, 909-917. (2001).
- (105) McBride, J. D., Watson, E. M., Brauer, A. B., Jaulent, A. M. and Leatherbarrow, R. J. (2002), Peptide mimics of the Bowman–Birk inhibitor reactive site loop. *Biopolymers*, 66: 79-92.
- (106) Mello, M.O., Tanaka, A.S., Silva-Filho, M.C. (2003). Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 103-112.
- (107) Morris A L, MacArthur M W, Hutchinson E G & Thornton J M (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12, 345-364.
- (108) Mosolov VV, Grigor'eva LI, Valueva TA (2001). Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review) *Prikl. Biokhem. Mikrobiol.* 37(6): 643-50.
- (109) Mosolov VV, Valueva TA (2005) Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 41(3): 261-82.
- (110) Moy, L. Y.; Billings, P. C. *Cancer Lett.* 1994, 85, 205-210.
- (111) Neurath H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* 1989, 14: 268–271.
- (112) Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins.* 1991;11(4):281-96.
- (113) Nigel M. Hooper, *Proteases: a primer Essays Biochem.* 2002;38:1-8.
- (114) Nishino, N.; Aoyagi, H.; Kato, T.; Izumiya, N. *Experientia* 1975, 31, 410-412.
- (115) Nishino, N.; Aoyagi, H.; Kato, T.; Izumiya, N. *J. Biochemistry* 1977, 82, 901-909.
- (116) Nishino, N.; Izumiya, N. *Biochim Biophys Acta* 1982,708, 233-235.38..
- (117) Nolan, E. M., e Walsh, C. T. (2009). How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, 10(1), 34-53.
- (118) Norioka S, Ikenaka T. Amino acid sequence of a trypsin-chymotrypsin inhibitor, B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biochem* 1983, 93: 479– 485<sup>A</sup>.
- (119) Norioka S, Ikenaka T. Amino acid sequence of trypsin chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): A discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitor. *J Biochem* 1983, 94: 589–599B.
- (120) O.L. Franco, R.C. dos Santos, J.A.N. Batista, A.C.M. Mendes, M.A.M. de Araújo, R.G. Monnerat, M.F. Grossi-de-Sá, S.M. de Freitas, Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*, *Phytochemistry.* 363 63(3) (2003) 343-349.

- (121) Odani, S.; Ikenaka, T. *J Biochem* 1973, 74, 697-715.
- (122) Otlewski J, Krowarsch D, Apostoluk W. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim Pol.* 1999;46:531-565.
- (123) Otlewski, Jacek & Krowarsch, D & Apostoluk, W. (1999). Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta biochimica Polonica.* 46. 531-65.
- (124) P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486 e 501
- (125) P. Kumar, a G.A. Rao, S. Hariharaputran, N. Chandra, L.R. Gowda, Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors. Pivotal role of ASP76 in the dimerization., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30425-32. doi:10.1074/jbc.M402972200.
- (126) P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, P.D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 352 e 367
- (127) Pannetier C, Giband M, Couzi P, Letan V, Hazier M, Tourneur J, Hau B (1997). Introduction of new traits into cotton through genetic engineering: insect resistance as example. *Euphytica* 96: 163-166.
- (128) Pavel Afonine. Choice of data-collection parameters based on statistic modeling" *Acta Crystallogr.* (2003). D59, 1145-1153.
- (129) Pavone, V.; Isernia, C.; Saviano, M.; Falcigno, L.; Lombardi, A.; Paolillo, L.; Pedone, C.; Buoen, S.; Naess, H. M.; Revheim, H.; Eriksen, J. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1994, 1047-1053.
- (130) Peter N Walsh, Syed S Ahmad, *Proteases in blood clotting, Essays In Biochemistry* Oct 01, 2002, 3895-111.
- (131) Philipp S, Kim YM, Durr I, Wenzl G, Vogt M, Flecker P. Mutation analysis of disulfide bonds in the trypsin-reactive subdomain of a BowmanBirk-type inhibitor of trypsin and chymotrypsin. Cooperative versus autonomous refolding of subdomains. *Eur J Biochem* 1998, 251: 854–862.
- (132) Qi RF, Song Z, Chi C (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application: *Acta Biochemica et Biophysica.* 37(5): 283-292.
- (133) R. J. Clark, J. Jensen, S. T. Nevin, B. P. Callaghan, D. J. Adams, D. J. Craik, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6545-6548;
- (134) R. J. Read, P. D. Adams, W. B. Arendall III, A. T. Brunger, P. Emsley, R. P. Joosten, G. J. Kleywegt, E. B. Krissinel, T. Lütkeke, Z. Otwinowski, A. Perrakis, J. S. Richardson, W. H. Sheffler, J. L. Smith, I. J. Tickle, G. Vriend, and P. H. Zwart A new generation of crystallographic validation tools for the Protein Data Bank. *Structure*, 19:1395–1412, 2011.
- (135) R. J. Read. Detecting outliers in non-redundant diffraction data. *Acta Cryst.*, D55:1759–1764, 1999.
- (136) R. Jaenicke and M. A. Lauffer, *Biochemistry*, 1969, 8, 3083–3092.
- (137) R.J. Baugh, C.G. Trowbridge, *Calorimetry of Some Trypsin-Trypsin Inhibitor Reactions*, *Biol. Chem.* 247 (1972) 7498-7501.
- (138) Raj SS, Kibushi E, Kurasawa T, Suzuki A, Yamane T, Odani S, Iwasaki Y, Ashida T (2002). Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 Å resolution. *J. Biochem.*, 132: 927-933.
- (139) Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology.* 7: 95-9.
- (140) Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:D320-D325.
- (141) Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290, 205-218.
- (142) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, 1961 (Pergamon Press, Oxford, 1961).

- (143) Rhodes, G. 2006. *Crystallography Made Crystal Clear*, 3rd ed. Academic Press.
- (144) Richardson JS. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* 1981, 34: 167–339.
- (145) Richardson, M. In *Methods in Plant Biochemistry*; Rogers, L., Ed.; Academic Press: New York, 1991; Vol 5, pp 259-305.
- (146) Robert M. Stroud, Lois M. Kay e Richard E. Dickerson, The Structure of Bovine Trypsin : Electron Density Maps of the Inhibited Enzyme at 5 Å and at 2.7 Å Resolution, 1976. *J Mol. Biol.* (1974) 83,185-208.
- (147) Roberts RM, Mathialagan N, Duffy JY, Smith GW. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5:385-436.
- (148) Robinson, N. C.; Neurath, H.; Walshy, K. A, Relation of the  $\alpha$ -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. *Biochemistry*, v. 12, n. 3, p. 420-426, 1973.
- (149) Rossmann, M. G. The molecular replacement method. *Acta Cryst.* A46, 73-82 (1990).
- (150) Ryan CA (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-449.
- (151) S. Chakraborty, S. Bhattacharya, S. Ghosh, A.K. Bera, U. Haldar, A.K. Pal, B.P. Mukhopadhyay, Asok Banerjee; Structural and interactional homology of clinically potential trypsin inhibitors: molecular modelling of Cucurbitaceae family peptides using the X-ray structure of MCTI-II, *Protein Engineering, Design and Selection*, Volume 13, Issue 8, 1 August 2000, Pages 551-555.
- (152) S. Gore, E. S. Garcia, P. M. S. Hendrickx, A. Gutmanas, J. D. Westbrook, H. W. Yang, Z. K. Feng, K. Baskaran, J. M. Berrisford, B. P. Hudson, Y. Ikegawa, N. Kobayashi, C. L. Lawson, S. Mading, L. Mak, A. Mukhopadhyay, T. J. Oldfield, A. Patwardhan, E. Peisach, G. Sahni, M. R. Sekharan, S. Sen, C. H. Shao, O. S. Smart, E. L. Ulrich, R. Yamashita, M. Quesada, J. Y. Young, H. Nakamura, J. L. Markley, H. M. Berman, S. K. Burley, S. Velankar, G. J. Kleywegt. Validation of Structures in the Protein Data Bank. *Structure* 25: 1916-1927, 2017.
- (153) S. Gore, S. Velanker and G. J. Kleywegt. Implementing an X-ray validation pipeline for the Protein Data Bank. *Acta Cryst.*, D68:478–483, 2012.
- (154) S.M. de Freitas, H. Ikemoto, M.M. Ventura, Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI)., *J. Protein Chem.* 18 (1999) 307-13.
- (155) Scheidig, A.J., Hynes, T.R., Pelletier, L.A., Wells, J.A. and Kossaiakoff, A. (1997) *Protein Sci.* , 6, 1806-1824.
- (156) Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0. (2015).
- (157) Song HK, Kim YS, Yang JK, Moon J, Lee JY, Suh SW. Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 1999, 293: 1133-1144
- (158) Sonia M. de Freitas, Luciane V. de Mello, Maria Cristina M. da Silva, Gerrit Vriendc, Goran Neshichb, Manuel M. Ventura, Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-chymotrypsin complex, , *FEBS Letters* 409 (1997) 121-128
- (159) Southan, C. (2001) A genomic perspective on human proteases. *FEBS Lett.* 498, 214-218.
- (160) Stroud, RM, A family of protein-cutting proteins. *Sci Am.* (1974) 231(1):74-88.
- (161) Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW (2002). Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev.* 22(4): 329-72.
- (162) T.L. Blundell & L.N. Johnson. *Protein Crystallography*, Academic Press Inc. London, (1976).
- (163) Tamir, A., Gangadharan, A., Balwani, S., Tanaka, T., Patel, U., Hassan, A., Benke, S., Agas, A., D'Agostino, J., Shin, D., Yoon, S., Goy, A., Pecora, A., Suh, K. S. (2016). The serine protease prostaticin (PRSS8) is a potential biomarker for early detection of ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, 9, 20. doi:10.1186/s13048-016-0228-9.
- (164) Tashiro M, Asao T, Hitara C, Takahashi K, Kanamori M (1990). The complete amino acid sequence of a major trypsin inhibitor from seeds of foxtail millet (*Setaria italica*). *J. Biochem.* 108: 669-672.

- (165) Tashiro M, Hashino, K, Shiozaki, M, Ibuki, F, Maki, Z (1987). The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor, *J. Biochem.* 102: 297-306.
- (166) Terada, S.; Sato, K.; Kato, T.; Izumiya, N. *FEBS Lett* 1978, 90, 89-92.
- (167) Travis S. Young, Douglas D. Young, Insha Ahmad, John M. Louis, Stephen J. Benkovic, Peter G. Schultz. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jul 2011, 108
- (168) 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. *J Biochem* 1986, 100: 1637-1646.
- (169) Tur Sinal A, Birk Y, Gertler A, Rigbi M (1972). A basic trypsin and chymotrypsin inhibitor from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 263: 666-672.
- (170) Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ (1997). Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant journal*, 12(2): 455-461.
- (171) Urzhumtsev A, Afonine PV, Lunin VY, Terwilliger TC, Adams PD. Metrics for comparison of crystallographic maps. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 70(Pt 10):2593-606.
- (172) V. B. Chen, W. B. Arendall III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.*, D66:12–21, 2010.
- (173) V. Quesada, G.R. Ordonez, L.M. Sanchez, X.S. Puente, C. Lopez-Otin The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res.*, 37 (2009), pp. D239-D243.
- (174) Vain P, Worland B, Clarke MC, Richard G, Beavis M, Liu H, Kohli A, Leech M, Snake J, Christou P (1998). Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (*Oryzacystatin-delta D86*) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 96: 266-271.
- (175) Valueva TA, Mosolov VV (2004). Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. *Biochemistry*, 69(11), 1305-1309.
- (176) Ventura, M. M., C. O. Martin, and L. Morhy. 1975. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vignasinasensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An. Acad. Bras. Cienc.* 47:335-346.
- (177) Voss R.H., U. Ermler, L.O. Essen, G. Wenzl, Y.M. Kim, P. Flecker, Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation., *Eur. J. Biochem.* 242 (1996) 122-31.
- (178) Voss RH, Ermler U, Essen LO, Wenzl G, Kim YM, Flecker P. Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation. *Eur J Biochem* 1996, 242: 122–131 11
- (179) W. Kabsch, XDS, *Acta Cryst.* D66 (2010) 125 e 132.
- (180) Wang, C. K., King, G. J., Northfield, S. E., Ojeda, P. G. and Craik, D. J. (2014), Racemic and Quasi-Racemic X-ray Structures of Cyclic Disulfide-Rich Peptide Drug Scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53: 11236-11241.
- (181) Wensing, A. *et al.*, Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Research.* v. 85, p. 59-74, 2010.
- (182) Williamson VM, Hussey RS (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant cell*, 8(10): 35-1745.
- (183) Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS J.* 2013; 280(22):5705-36.
- (184) Wlodawer, Alexander *et al.* "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures" *FEBS journal* vol. 275,1 (2007): 1-21.
- (185) wwPDB. The standard geometry compilation used in wwPDB validation protocols, 2012.
- (186) X.S. Puente, L.M. Sanchez, C.M. Overall, C. Lopez-Otin Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.*, 4 (2003), pp. 544-558.

- (187) Z. Feng. Validation-pack. <http://sw-tools.pdb.org/>
- (188) Zablotna, E.; Kazmierczak, K.; Jaskiewicz, A.; Stawikowski, M.; Kupryszewski, G.; Rolka, K. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 292, 855–859.
- (189) Zhu, G.; Huang, Q.; Zhu, Y.; Li, Y.; Chi, C.; Tang, Y. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1546, 98-106.



## Anexo I

Análise da pureza e sequência dos peptídeos por espectrometria de massa.

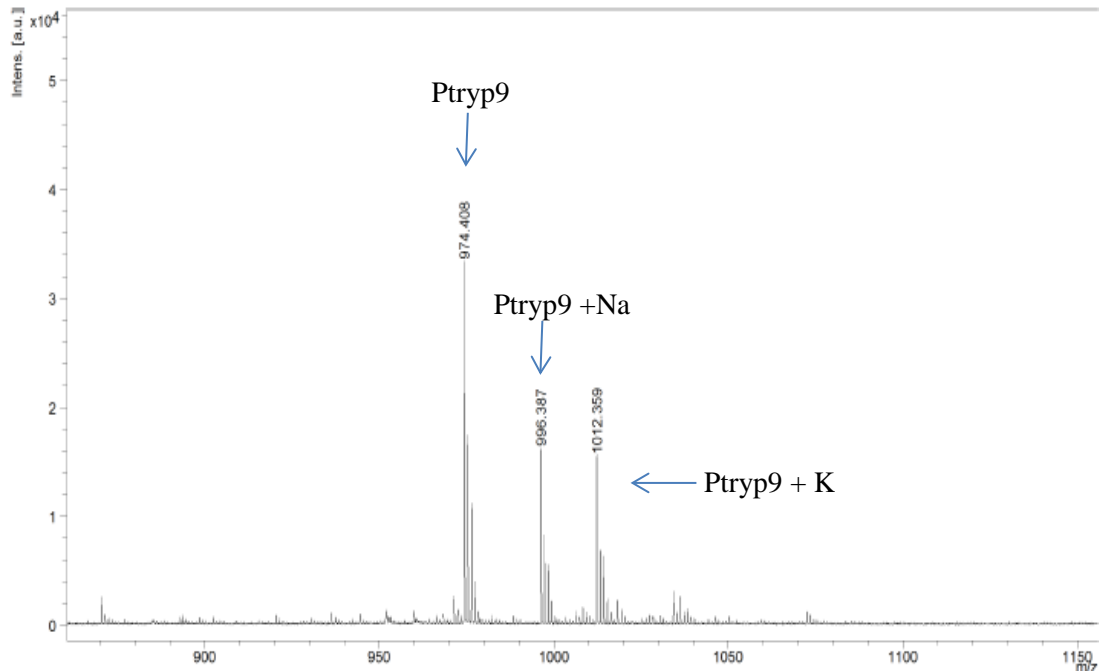


Figura 1. Análise do peptídeo ptryp9.

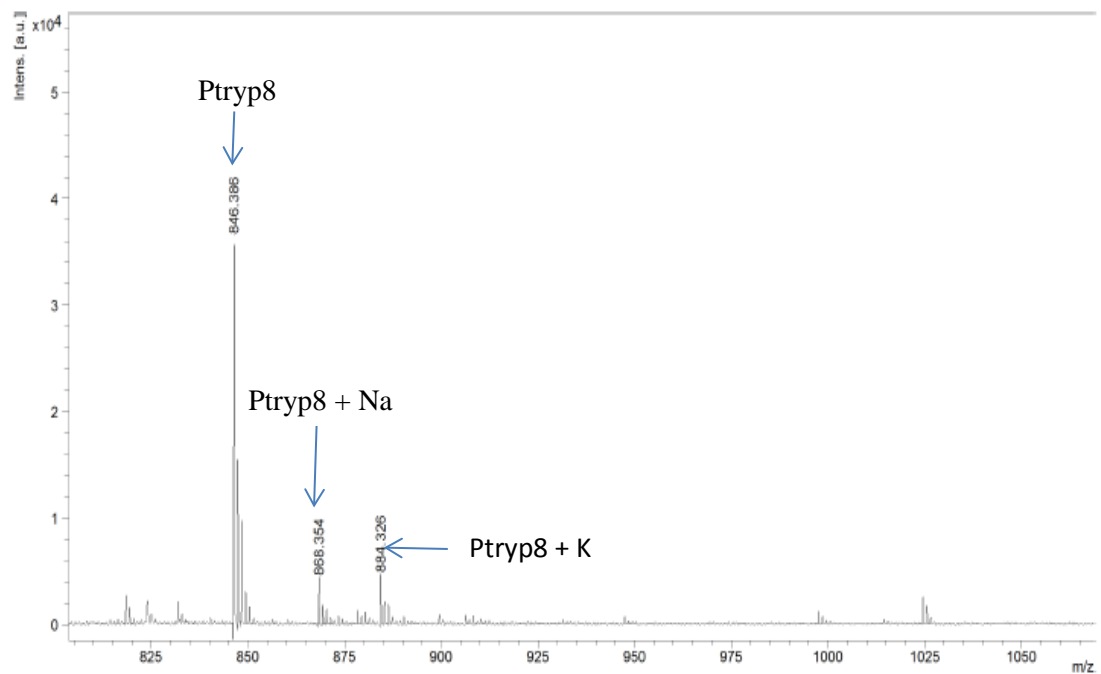


Figura 2. Análise do peptídeo Ptryp8.

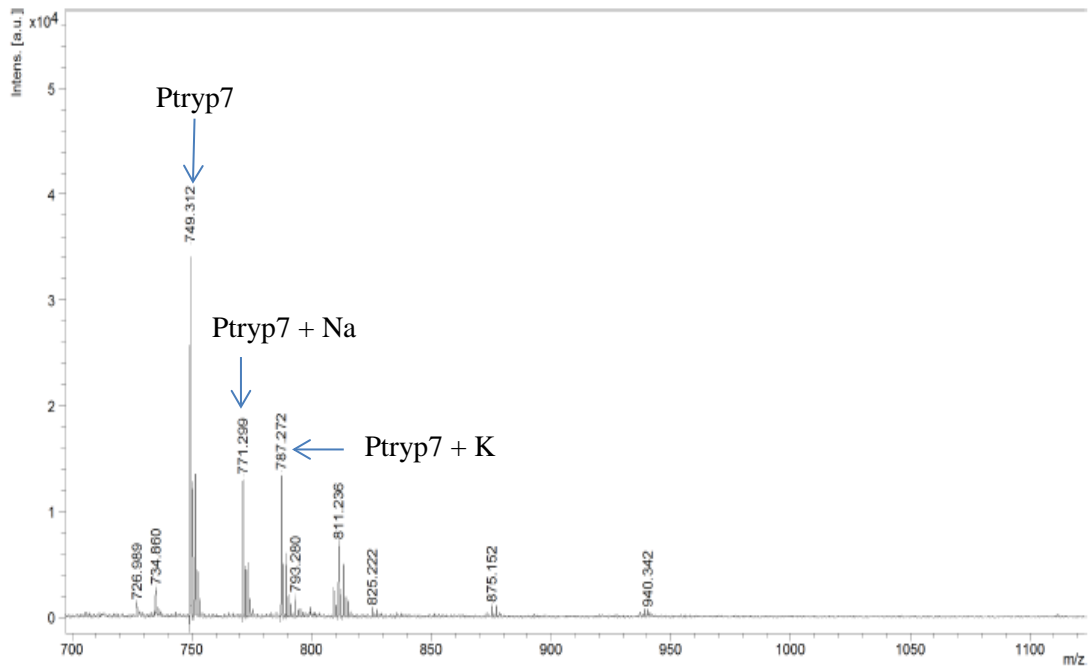


Figura 3. Análise do peptídeo ptryp7.

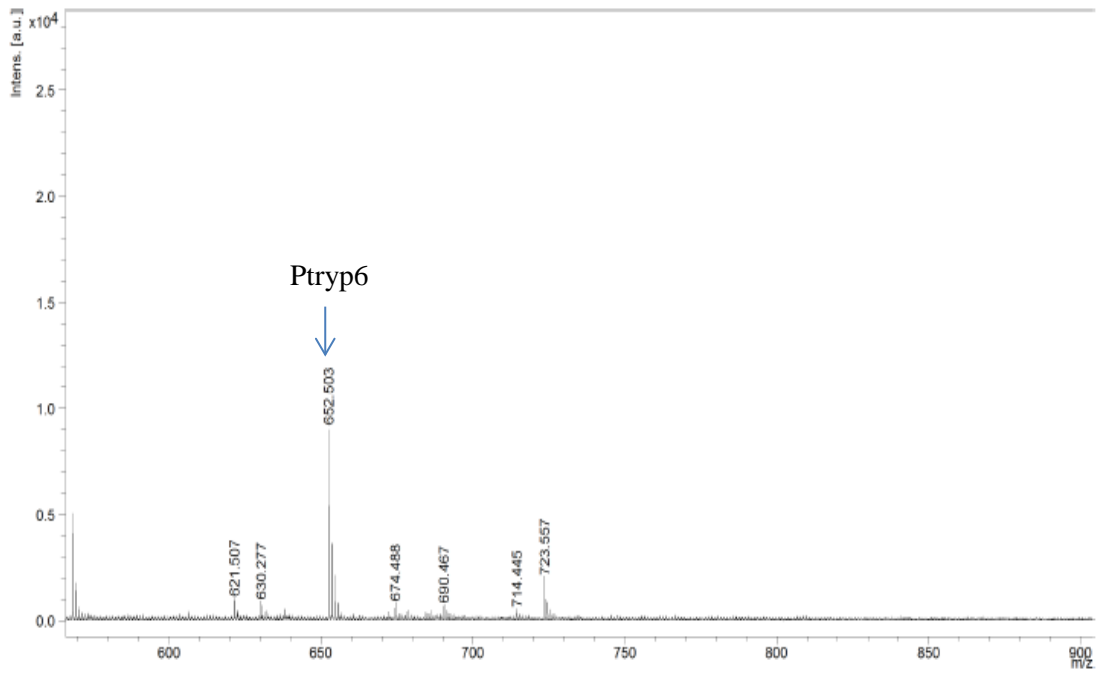


Figura 4. Análise do peptídeo Ptryp6.



## Crystallographic structure of a complex between trypsin and a nonapeptide derived from a Bowman-Birk inhibitor found in *Vigna unguiculata* seeds

João Paulo Campos Fernandes<sup>a</sup>, Azadeh Mehdad<sup>a,1</sup>, Napoleão Fonseca Valadares<sup>a</sup>,  
Caroline Barbosa Farias Mourão<sup>b</sup>, Manuel Mateus Ventura<sup>a,1</sup>,  
João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa<sup>a,\*\*</sup>, Sonia Maria de Freitas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biophysics, Department of Cell Biology, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Toxinology, University of Brasília, DF, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bowman-Birk inhibitors  
Protease inhibitors  
Protein crystallographic structure  
Breast cancer  
*Vigna unguiculata*

### ABSTRACT

Natural inhibitors of proteases have been classified into different families, among them is the Bowman-Birk Inhibitor (BBI) family. Members of BBI have two structurally reactive loops that simultaneously inhibit trypsin and chymotrypsin. Here, we have investigated the binding of bovine trypsin by a cyclic nonapeptide, named PTRY9 (CTKSIPPQC), derived of the black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI) from *Vigna unguiculata* seeds. This peptide was synthetically produced with the disulfide bond restraining its conformation to mimic the reactive loop that inhibits trypsin. PTRY9 complexed to pancreatic bovine trypsin was crystallized in orthorhombic and trigonal space groups,  $P2_12_12_1$  and  $P3_221$ , with maximum resolutions of 1.15 and 1.61 Å, respectively. The structures presented refinement parameters of  $R_{\text{work}} = 14.52\%$  and  $R_{\text{free}} = 15.59\%$ ;  $R_{\text{work}} = 15.60\%$  and  $R_{\text{free}} = 18.78\%$ , and different surface area between the peptide and the enzyme of 1024 Å<sup>2</sup> and 1070 Å<sup>2</sup>, respectively. The binding site of the PTRY9 is similar to that found for BTCI as shown by a r.m.s.d. of 0.358 Å between the superimposed structures and the electrostatic complementary pattern at the enzyme-peptide interface. Additionally, enzyme inhibition assays show that the affinity of trypsin for PTRY9 is smaller than that for BTCI. *In vitro* assays revealed that, like BTCI, this synthetic peptide is not cytotoxic for normal mammary epithelial MCF-10A cells, but exerts cytotoxic effects on MDA.MB.231 invasive human breast cancer cells.

### 1. Introduction

Proteases are involved in all aspects of life by participating in multiple biological processes in all living organisms. As such, proteases regulate DNA replication and transcription, cell proliferation and differentiation, tissue morphogenesis and remodeling, heat shock and unfolded protein responses, angiogenesis, neurogenesis, wound healing, stem cell mobilization, hemostasis, blood coagulation, inflammation, immunity, autophagy, and apoptosis [1–2]. Therefore, alterations in proteolytic systems underlie numerous pathological conditions including cancer, neurodegenerative disorders, inflammatory and cardiovascular diseases. Through evolution, proteases have adapted to the wide range of conditions thereby using different catalytic mechanisms for substrate hydrolysis. Based on their activity, proteases can be categorized as serine, cysteine, aspartic acid, metallo

and threonine proteases [3–6].

Natural inhibitors of serine proteases belonging to the Kunitz and Bowman Birk families play an important role as regulators in several of those biological pathways [7,8]. In plants, the biological processes involving protease inhibition is not fully known. However, it is consensual that inhibitors play a crucial role in storage and protecting the seed or whole plant from pathogens [9,10].

Bowman-Birk Inhibitors (BBIs) are a well-known family of a typical canonical serine protease, which is found in various plant sources. BBIs, originally characterized from soybean, are small molecules (60–70 amino acid residues) with highly conserved disulfide bonds [11,12]. BBIs double inhibitory activity is towards chymotrypsin/trypsin or trypsin/trypsin. With the trypsin binding domains, the P<sub>1</sub> residue is lysine or arginine and for chymotrypsin, the P<sub>1</sub> residue is leucine or tyrosine or phenylalanine [13,14].

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [joaobarbosa@unb.br](mailto:joaobarbosa@unb.br) (J.A.R.G. Barbosa), [nina@unb.br](mailto:nina@unb.br) (S.M.d. Freitas).

<sup>1</sup> in memoriam.

BBI have been described as carcinogenesis suppressor agents of several types of cancer in animal and *in vitro* transformation systems and had no detectable adverse or toxic effects [15–22]. In addition, BBI also may play an effective role in the treatment of inflammatory diseases by modifying various inflammatory pathways [23].

The Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI) is a member of the BBI family isolated from *Vigna unguiculata* seeds (c.v. Seridó). BTCI consist of 83 amino acid residues (9071 Da) presenting seven disulfide bonds that are responsible for the structural stability of the protein, as well as the canonical conformation of loops containing their independent reactive sites against proteases [24–28].

BTCI is composed mainly of anti-parallel  $\beta$ -sheets containing reactive sites for trypsin (Lys26) and chymotrypsin (Phe53) in two independent canonical loops connected by the  $\beta$ -hairpin motif [28]. Furthermore, BTCI forms stable complexes with trypsin (binary complex) and trypsin and chymotrypsin simultaneously (ternary complex) presenting binding constants ranging from  $10^7$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}$  [29]. The binding of trypsin to BTCI is an endothermic, spontaneous, and entropically driven process while the binding of chymotrypsin to BTCI is an exothermic process [29–31]. In addition, high resolution crystal structures of BTCI in complex with  $\beta$ -trypsin (PDB code 2G81) and simultaneously in complex with both trypsin and chymotrypsin (PDB code 3RU4) revealed the atomic details of BTCI protease interactions [28].

Besides biochemical and biophysical features, it has been demonstrated that BTCI enhanced guanylin-induced natriuresis through an overwhelming increase in urine flow,  $\text{Na}^+$  excretion and glomerular filtration rate [32], and also has a protective effect on bradykinin towards plasma serine proteases cleavage [33]. In agreement with other BBIs [34–36], BTCI is particularly effective in suppressing carcinogenesis through induction of apoptosis. It has also been demonstrated that BTCI inhibits cell proliferation, induces cell cycle arrest and mitochondrial impairment following proteasome 20S inhibition [37–39]. Taken together, these pleiotropic effects of BTCI provided a new insight into the clinical application as well as the potentiality for natural drug development. Many proteases inhibitors are a major focus of attention for the pharmaceutical industry as potential drug targets. The most frequently employed strategy for the development of protease inhibitors involves the synthesis of substrate mimics that can competitively bind to the active site of the enzyme, thus blocking or limiting normal substrate turnover.

Here, the structure of the complex between trypsin and a peptide formed by 9 amino acid residues derived from the BTCI's trypsin-reactive loop is described. Two crystal forms were solved in space groups  $P2_12_12_1$  and  $P3_221$  with 1.15 and 1.61 Å resolutions, respectively. Moreover, a cell viability test of the peptide demonstrated a cytotoxic effect on breast cancer cells in a dose-dependent manner, absent in normal mammary epithelial cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Inhibitory activity assay

The peptide PTRY9 was firstly tested against trypsin by means of chromogenic assay [40]. The peptidase inhibition was obtained by measuring the hydrolysis of the synthetic chromogenic substrate *N*-Benzoyl-*D*L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) (Sigma-Aldrich, USA) in the presence trypsin (bovine pancreatic trypsin; EC 3.4.21.4). Protein concentrations were determined by spectrophotometry as previously described (PMID: 17142290) [28]. Trypsin stock solution was initially prepared in a 1.0 mM HCl solution (initial concentration of 2.8  $\mu\text{M}$ ). Its respective substrate, BAPNA, was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) at 50 mg/mL, being subsequently dissolved in trypsin assay buffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.2). PTRY9 was dissolved in the trypsin assay buffer.

The experiment was performed on flat bottom 96-well polystyrene

plates in a total volume of 280  $\mu\text{L}$  per well. Plate assembly (serial dilutions of the peptide and pipetting of buffer, enzyme and substrate) was done by using the MicrolabSTARlet robotic platform (Hamilton Company, USA). Forty microliters of 2.8  $\mu\text{M}$  enzyme ( $C_f = 400 \text{ nM}$ ) were incubated with 40  $\mu\text{L}$  of peptide at different concentrations ( $C_f = 0.0625\text{--}50.0 \mu\text{M}$ ) at 25 °C for 20 min. Each peptide concentration was applied in triplicate. Then, 200  $\mu\text{L}$  of substrate ( $C_f = 0.8 \text{ mM}$ ) was added to the previous solution, and the product release (*p*-nitroaniline) was monitored at the FlexStation® 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) spectrophotometer at  $\lambda = 410 \text{ nm}$  for 10 min at 25 °C, with records at every 30 s.

The residual enzyme activity at different peptide concentrations was calculated using the absorbance ( $A_{410}$ ) given at 10 min. Positive control of the reaction (100 % enzyme activity, or 0 % inhibition) was performed in the presence of enzyme and absence of inhibitor (40  $\mu\text{L}$  enzyme, 40  $\mu\text{L}$  buffer and 200  $\mu\text{L}$  substrate). The negative control for baseline subtraction was performed in the absence of enzyme (80  $\mu\text{L}$  buffer and 200  $\mu\text{L}$  substrate). As control for trypsin inhibition, BPTI/aprotinin (Sigma-Aldrich) was used, but only at a small concentration (400 nM) in comparison to the peptide (data not shown). The experiments were performed on three replicates and the values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n \geq 3$ ).

### 2.2. Cell viability test of peptides on cell lines

Human breast cancer cells MDA.MB.231 (highly invasive human breast cells) and MCF-10A (normal mammary epithelial cells) were purchased from Rio de Janeiro Cell Bank (RJCB). All cell culture reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). MCF-10A cells were maintained in Mammary Epithelial Cell Growth Medium supplemented with 5 % horse serum, 20 ng/mL epidermal growth factor, 10  $\mu\text{g/mL}$  insulin, 0.5  $\mu\text{g/mL}$  hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin). MDA.MB.231 cells were maintained in Leibovitz's L-15 medium, supplemented with 10 % (v/v) of fetal bovine serum and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin). Cells were maintained at 37 °C under humidified air containing 5 %  $\text{CO}_2$  for MCF-10A and without  $\text{CO}_2$  in the case of MDA.MB.231. Cells were seeded into a 96-well plate and incubated for 24 h (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) followed by starvation using serum-free medium. Sample solutions were loaded on this plate which was further incubated for 24 h. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/mL, 10  $\mu\text{L/well}$ ) was utilized to form the formazan after a 4 h incubation. Cell-produced-formazan was dissolved in DMSO (100  $\mu\text{L/well}$ ) [41]. The absorbance was recorded by using a SpectraMax M3 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), then correlated with cell viability. PTRY9 concentrations and controls had 5 replicates in single 96-well plate and two independent experiments were performed.

### 2.3. Crystallization assays

The peptide PTRY9 (CysThrLysSerIleProProGlnCys) with the cysteine residues forming a disulfide bond was purchased from Aminotech (São Paulo, Brazil). As shown in the results, crystal structure analysis revealed that the PTRY9 sample contained two distinct peptides, which differ only in the stereochemistry of the carbon alpha atom of Cys1. We refer to these two peptides as PTRY9-L (with L-Cys1) and PTRY9-D (with D-Cys1). The co-crystallization of the complex between peptide PTRY9 and bovine trypsin (Sigma Aldrich) was carried out by the sitting drop and hanging drop vapor diffusion methods using a crystallization workstation (Mosquito Crystal Nanolitre Protein Crystallization Robot, TTP Labtech, United Kingdom). Crystallization screening was performed using commercial kits (Hampton Research, Jena Bioscience, Molecular Dimensions) in a temperature-controlled room at 22 °C. Trypsin and PTRY9 were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, 20 mM

CaCl<sub>2</sub>, pH 8.2. In order to optimize the occupation of the enzyme sites by the inhibitor, stoichiometric ratio of PTRY9/trypsin was about 20 fold, using trypsin and peptide at concentrations of 2.6 mM and 51.0 mM, respectively. All drops were made by mixing 150 nL complex solution with an equal volume of reservoir solution on 96-well plates, in which the 300 nL final volume was equilibrated against 100 μL of reservoir solution. Optimization of the crystallization conditions was performed manually in 24-well plates with a drop of 3 μL of final volume equilibrated against 500 μL of reservoir solution.

#### 2.4. Crystallographic structure solution

High-resolution diffraction data of the complex were collected at the MX2 beamline of the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil) at 100 K and wavelength 1.20 Å on a Pilatus 2 M detector from Dectris. Immediately before diffraction data collection, crystals were cryoprotected in mother liquor supplemented with glycerol to a final concentration of 10 % (v/v). Data collection was performed under N<sub>2</sub> gas, adopting goniometer oscillation of 0.5 ° and an exposure of 10 s for all experiments. The diffraction data were indexed, integrated and scaled using the program XDS [42]. Molecular replacement was performed with Phaser [43] using the coordinates of PDB 2G81 [28] as the template. The structure refinement and model building were performed using PHENIX [44] and COOT [45] programs, respectively. PHENIX was used for electron density map calculations. Explicit riding hydrogen atoms and anisotropic B factors for polypeptide non-hydrogen atoms were used in the refinement procedures. The values of  $R_{work}$  and  $R_{free}$  and the stereochemistry parameters of the resulting models were evaluated using Molprobrity program [46]. The structures were deposited in the protein data bank (PDB) under codes 6EAT and 6E5M for orthorhombic and trigonal structures, respectively.

### 3. Results

#### 3.1. Inhibitory activity and cell viability assays

The peptide was designed to represent only the reactive loop (9 amino acid residues) derived from BTC1, responsible for the inhibition of trypsin. This inhibitory activity against trypsin and its cytotoxic effects on breast normal (MDA.MB.231) and highly invasive (MDA.MB.231) cancer cells were evaluated before to crystallization assays. The inhibitory assay showed that PTRY9 required a concentration of about 50 μM to give a total inhibition of trypsin (Fig. 1). The

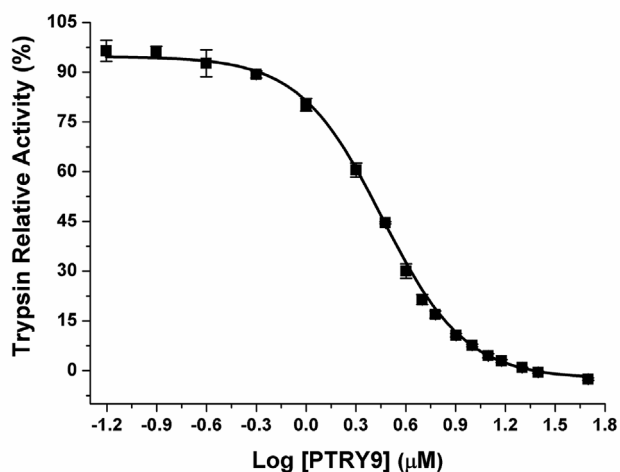


Fig. 1. Inhibitory activity of the PTRY9 towards trypsin. PTRY9 required a concentration of about 50 μM (anti Log [1.7]) to propitiate the total inhibition of trypsin.

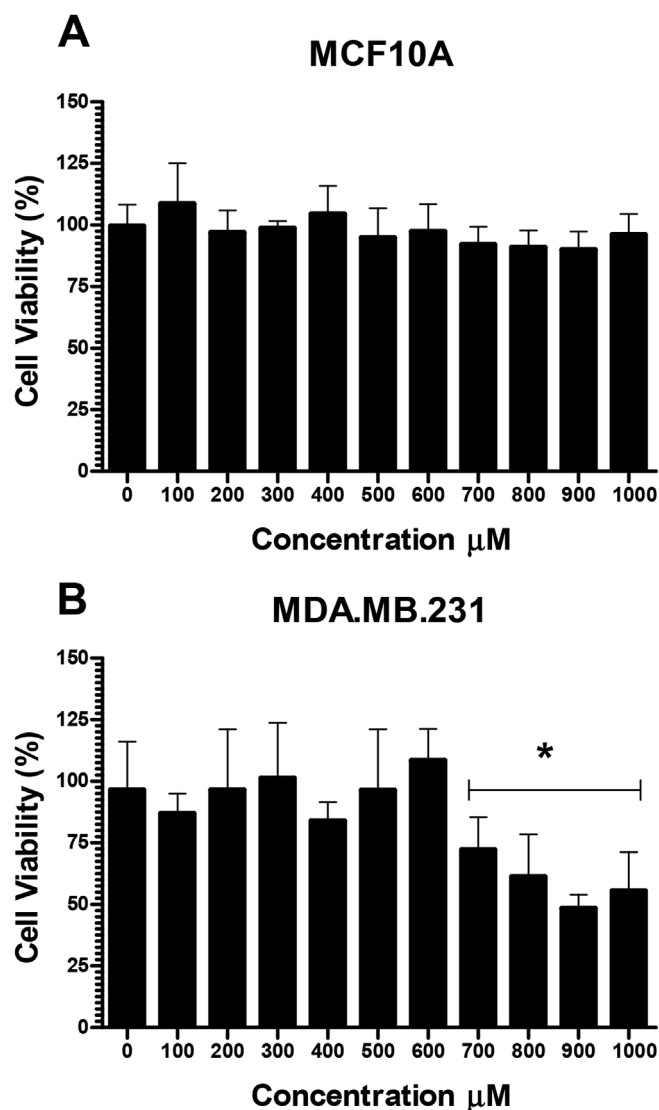


Fig. 2. Cytotoxic effects induced by the PTRY9-L peptide. A) Normal mammary epithelial cells (MCF-10A) and B) Highly invasive human breast cells (MDA.MB.231) were incubated with PTRY9 peptide (0–1000 μM) for 24 h. Cell viability was determined by the MTT assay [41]. Results are presented as mean ± S.D. of two separate experiments conducted in triplicate, \*P < 0.05 versus untreated cells.

cytotoxicity effect of the PTRY9 on viability of MDA.MB.231 and MCF-10A cells was determined using the MTT assay [41]. Cells were incubated with peptide at concentrations ranging from 0 to 1000 μM for 24 h. Results showed that PTRY9 does not exert cytotoxic effects in normal mammary epithelial cells MCF-10A cells (Fig. 2), as also observed for BTC1 inhibitor [39]. In contrast, cytotoxic effect on MDA.MB.231 highest invasive breast cancer cells was observed at concentrations from 700 μM.

#### 3.2. Crystallization assays

The three-dimensional structure of the PTRY9 in complex with trypsin was solved into orthorhombic and trigonal space group by high-resolution diffraction method. The orthorhombic and trigonal crystals PTRY9-trypsin complex were obtained in different crystallization conditions, respectively 0.1 M HEPES sodium pH 7.5 and 1 M monohydrate lithium sulfate; and 0.1 M Tris pH 8.5 and 2 M ammonium sulfate (Supplementary Fig. 1). The orthorhombic crystal diffracted to 1.15 Å resolution, and the indexing of the reflections indicated the assignment

**Table 1**  
Crystallographic data collection and refinement statistics.

Parameter	Value	
Space group	$P2_12_12_1$	$P3_22_1$
Wavelength (Å)	1.200	1.200
Resolution range	29.92–1.15 (1.19–1.15)	23.25–1.61 (1.67–1.61)
Unit cell (a, b, c) (Å)	59.83, 61.56, 67.03	68.69, 68.69, 74.57
Total reflections	1157232 (34125)	121757 (10811)
Unique reflections	83027 (6078)	26036 (2423)
Multiplicity	13.9 (5.6)	4.7 (4.4)
Completeness (%)	93.78 (69.34)	97.39 (92.65)
Mean I/sigma(I)	29.60 (1.12)	12.78 (1.39)
Wilson B-factor	11.68	20.88
R-merge	0.051 (1.296)	0.070 (0.727)
R-meas	0.052 (1.415)	0.079 (0.822)
R-pim	0.012 (0.550)	0.035 (0.376)
CC1/2	1 (0.582)	0.998 (0.674)
CC*	1 (0.858)	0.999 (0.897)
Reflections used in refinement	83128 (6073)	26035 (2422)
Reflections used for $R_{free}$	2002 (136)	1984 (182)
$R_{work}$	0.145 (0.398)	0.156 (0.303)
$R_{free}$	0.156 (0.421)	0.188 (0.354)
CC (work)	0.973 (0.701)	0.464 (0.087)
CC (free)	0.977 (0.705)	0.467 (0.027)
Number of non-hydrogen atoms	2203	1966
macromolecules	1773	1727
ligands	61	6
solvent	369	233
Protein residues	232	232
RMS (bonds)	0.024	0.009
RMS (angles)	1.45	1.24
Ramachandran favored (%)	97.80	99.12
Ramachandran allowed (%)	2.20	0.88
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	0.00	0.00
Clashscore	4.16	0.29
Average B-factor	17.96	26.18
macromolecules	14.82	24.67
ligands	42.01	81.18
solvent	29.07	35.93
Number of TLS groups	5	11

Statistics for the highest resolution shell are shown in parentheses.

of the space group of  $P2_12_12_1$  with unit cell dimensions  $a = 59.83$  Å,  $b = 61.56$  Å,  $c = 67.03$  Å and angles  $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$ . The reflections obtained from the trigonal crystal were indexed up to  $1.61$  Å resolution, revealing a  $P3_22_1$  space group with unit cell dimensions  $a = b = 68.69$  Å,  $c = 74.57$  Å and angles  $\alpha = \beta = 90.00^\circ$  and  $\gamma = 120.00^\circ$  (Table 1).

### 3.3. Crystallographic structure solution

The structures were solved by molecular replacement using the structure of trypsin in complex to BTCI as the search model (PDB 2G81). In both crystals, the asymmetric unit content was one trypsin molecule and one peptide molecule. In the orthorhombic crystal structure each trypsin interacts with six neighboring trypsin molecules, while the trigonal structure presents a lower solvent content, with each trypsin interacting with nine symmetry related trypsin molecules (data not show). The peptide crystallized in the trigonal space group has a D-cysteine in position 1 (PTRY9-D) while the peptide crystallized in the orthorhombic space group (PTRY9-L) presents the usual L-cysteine as its N-terminus (Fig. 3). The final structures were refined to  $R_{work} = 0.1452$  and  $R_{free} = 0.1559$  for orthorhombic PTRY9-L and  $R_{work} = 0.1560$  and  $R_{free} = 0.1878$  for trigonal PTRY9-D. The structures were deposited in the PDB under codes 6EAT and 6E5M for orthorhombic and trigonal structures, respectively.

In both crystal forms, continuous electron density was observed for the 9 amino acid residues and revealed the expected cyclic structure

due to a disulfide bond between L/D-Cys1 and L-Cys9 (Fig. 3). No secondary structure elements are present in the peptide structure, which is constrained by its cyclic nature and a great number of polar interactions with trypsin (Table 2). The  $C_\alpha$  superposition of PTRY9-L and PTRY9-D onto BTCI yields an RMSD of 0.295 and 0.566 Å, respectively (Fig. 4). The peptide bond between Ile5 and Pro6 is observed in a *cis*-conformation in both peptides as in the original BTCI structure. These same residues are involved in non-polar contacts with symmetric neighboring trypsin loops encompassing Ala132 to Gln135 (data not shown). The crystal structures reveal that when bound to trypsin, the PTRY9-L or -D adopts similar conformations to the full BTCI in complex with trypsin (PDB 2G81). Although similar symmetry contacts occur, the PTRY9-L in the orthorhombic crystal is more exposed to the solvent than PTRY9-D. This feature allows an additional salt bridge between the free terminal carboxylic acid of Cys9 of the PTRY9-D and the side chain nitrogen of Lys188 from a neighboring trypsin chain (Table 2).

In both crystals P1-Lys3 is clearly positioned on the active site of trypsin, where its nitrogen zeta atom forms a salt-bridge with the side chain of S1-Asp189 and interacts with two buried water molecules (Figs. 3, 5 and 6).

## 4. Discussion

The trypsin inhibition assay showed that PTRY9 is a less potent inhibitor than BTCI, since the total inhibition of trypsin by the peptide and BTCI occurs at concentrations of 50  $\mu$ M and 6  $\mu$ M [30], respectively. Despite that, PTRY9 binds to trypsin in a conformation very similar to that of BTCI bound to trypsin. This result suggests that amino acid residues away from the reactive loop, therefore absent in the PTRY9, might be of some importance for the inhibitory activity, and is supported by previous reports [47,48].

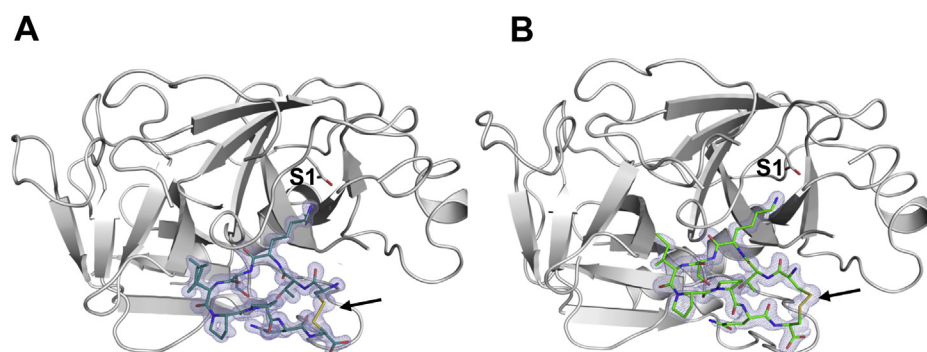
The cytotoxicity effects of the PTRY9 on the viability of MDA.MB.231 and MCF-10A cells were similar to those reported for BTCI [39]. PTRY9 is not cytotoxic for normal mammary epithelial MCF-10A cells, but exerts cytotoxic effects on MDA.MB.231 invasive human breast cancer cells. However, cytotoxic effects on MDA.MB.231 cells were observed at concentrations from 700  $\mu$ M and above, but without a clear dose-dependent behavior ( $P^* < 0.05$ ; Fig. 2), unlike what was perceived for BTCI where cytotoxic effects were observed at 100  $\mu$ M [39]. Although there are fewer contacts between the PTRY9 and trypsin when compared to the BTCI, these differences might not fully explain the observed 600  $\mu$ M difference in the cytotoxicity experiment. Another possible source for the discrepancy maybe the other reactive loop present in the BTCI, this other site might play a role in the cytotoxicity events in the cell.

The PTRY9 co-crystal structures solved by molecular replacement in the orthorhombic and trigonal space groups were similar to the BTCI-trypsin structures, as indicated by the superimposition of the three structures (Fig. 4). Structural analysis of the peptides interface complexes by accessible solvent area also indicated this similarity. As evaluated, 572 Å<sup>2</sup> of the peptide surface is buried in the orthorhombic space group representing a percentage of 56 % of the total accessible solvent area (1024 Å<sup>2</sup>). For the PTRY9-D, in trigonal space group, 580 Å<sup>2</sup> are buried, representing 54 % of the 1070 Å<sup>2</sup> area accessible to the solvent. In the case of the BTCI trypsin complex 521 Å<sup>2</sup> of inhibitor is buried in the trypsin pocket, corresponding to 51 % of the 1031 Å<sup>2</sup> total area.

All side chains of the peptide in both crystal structures adopt the same rotamers, except for Cys1. However, slightly different conformations in main chain torsion angles arise from the presence of the D-cysteine. The observation of a D-cysteine at position 1 leads to slightly different main chain torsion angles in each peptide, which is accompanied by a structural difference in the disulfide bond of the peptides. As expected, the PTRY9-L with two L-cysteines in the  $P2_12_12_1$  space group is closer to that observed for BTCI-trypsin complex (Fig. 4).

The polar interactions that occur between PTRY9 and trypsin are



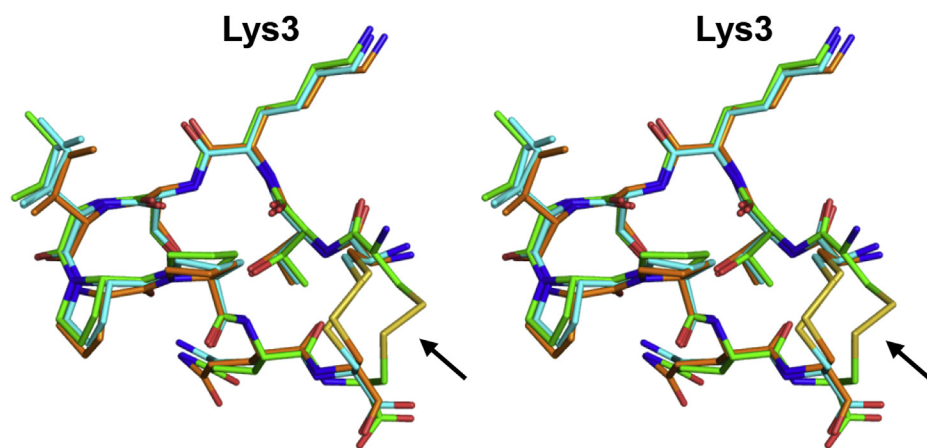


**Fig. 3.** Crystallographic structures of the PTRY9 bound to trypsin. **A)** Crystallographic model of the complex between trypsin and PTYP9-L presenting the usual L-cysteine in position 1 as its N-terminus (yellow – indicated by arrow) in the orthorhombic space group. **B)** Crystallographic model of the complex between trypsin and PTYP9-D presenting the D-cysteine in position 1 (yellow – indicated by arrow) in the trigonal space group. The electron density from a  $2F_o - F_c$  omit map (contoured at  $1.5 \sigma$ ) is depicted in gray around both peptides that were omitted in the calculation. The residue Asp189 from the S1 pocket is shown in sticks. Produced with PyMOL [49]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

**Table 2**  
Polar contacts between PTRY9 and trypsin  $3.2 \text{ \AA}$  apart.

L-Peptide Orthorhombic	Dis <sup>a</sup>	Trypsin	D-Peptide Trigonal	Dis <sup>a</sup>	Trypsin	BTCl	Dis <sup>a</sup>	Trypsin
Cys1 - N	2.7	Gly216 - O	Dcy1 - N	2.8	Gly216 - O	Cys22 - O	2.8	Ser217 - OG
Cys1 - O	3.1	Gly216 - O	Dcy1 - O	3.2	Gly216 - N	Cys24 - N	2.9	Gly216 - O
Thr2 - O	2.8	Gly216 - N	Thr2 - O	2.9	Gln192 - NE2	Cys24 - O	3.1	Gly216 - N
Lys3 - N	2.8	Gln192 - NE2	Lys3 - N	2.9	Ser195 - OG	Lys26 - N	2.8	Ser195 - OG
Lys3 - N	3.0	Ser195 - OG	Lys3 - N	3.2	Ser214 - O	Lys26 - N	3.1	Ser214 - O
Lys3 - NZ	2.9	Ser214 - O	Lys3 - NZ	3.0	Ser190 - OG	Lys26 - NZ	2.9	Ser190 - O
Lys3 - NZ	2.9	Ser190 - OG	Lys3 - NZ	2.9	Ser190 - O	Lys26 - NZ	3	Ser190 - OG
Lys3 - NZ	3.0	Ser190 - O	Lys3 - NZ	3.1	Asp189 - OD1	Lys26 - NZ	3.2	Asp189 - OD2
Lys3 - O	2.6	Asp189 - OD1	Lys3 - O	2.7	Gly193 - N	Lys26 - O	2.7	Gly193 - N
Lys3 - O	2.7	Gly193 - N	Lys3 - O	2.9	Ser195 - N	Lys26 - O	2.8	Ser195 - N
Lys3 - O	3.2	Ser195 - N	Lys3 - O	3.2	Asp194 - N	Lys26 - O	3.3	Asp194 - N
Ile5 - N	3.0	Asp194 - N	Ile5 - N	3.1	Phe41 - O	Ile28 - N	3	Phe41 - O
Gln8 - NE2	2.7	Phe41 - O	Gln8 - NE2	2.9	His57 - O	Ile28 - O	2.8	Lys60 - NZ
			Cys9-O	3.3	Lys188-N			
						Arg33 - NH1	3.1	Ser96 - O
						Arg33 - NH2	3.1	Ser96 - O
						Ser35 - OG	2.8	Gln175 - OE1

<sup>a</sup> Distances are shown in  $\text{\AA}$ .

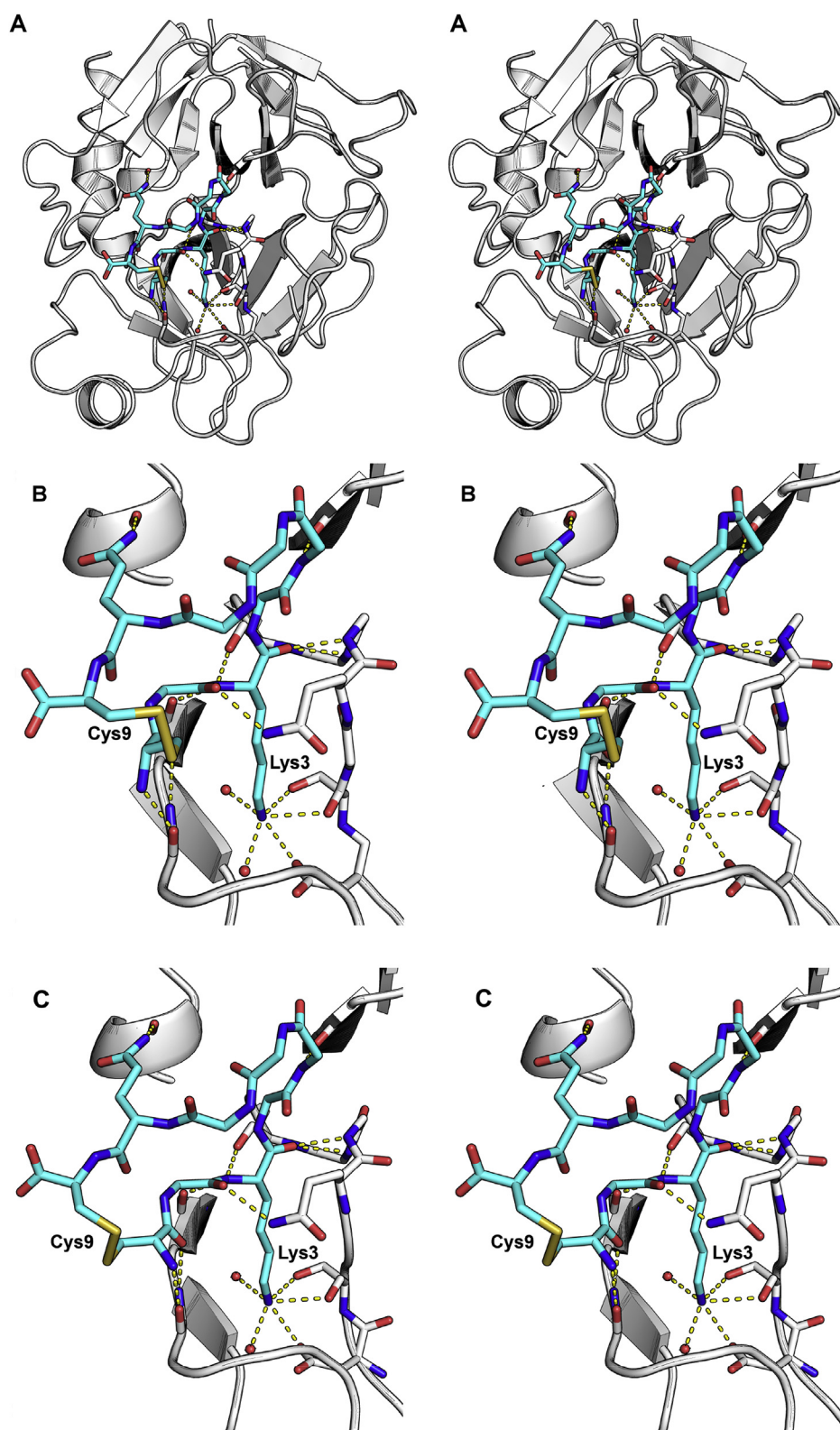


**Fig. 4.** Stereo view (cross-eyed) of the superposition of PTRY9-L, PTRY9-D and the reactive loop of BTCl obtained from its complex with trypsin. Structural differences in PTRY9-D (green) and PTRY9-L (cyan) conformations are observed mainly in the disulfide bond region (indicated by a black arrow). P1 (Lys3) is labeled. Ile5 and Pro6 are observed in a *cis*-conformation in both peptides and in the BTCl structure (orange). Produced with PyMOL [49]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

similar in orthorhombic and trigonal crystal, and are listed in Table 2 alongside with those of BTCl in complex with trypsin. Details of this interface in the orthorhombic structure are depicted in Fig. 5. The extended positively charged side chain of Lys3 has electrostatic complementarity to the negatively charged side chain of S1 Asp189 in the specificity pocket of the trypsin (Figs. 5 and 6). Interestingly, the PTRY9 structures present the two buried water molecules, as observed in the BTCl-trypsin complex (Fig. 5) [28]. Besides the Lys26-Asp189 salt bridge, several polar contacts observed in the PTRY9-trypsin co-crystal are present in the BTCl-trypsin complex (Table 2). In addition, these polar contacts are maintained independently of the crystalline group

and the D or L configuration in Cys1. The high number of contacts between BTCl and trypsin (Table 2) is due to the more extended interface of the BTCl-trypsin complex than PTRY9-trypsin complex. It is noteworthy that slight conformational differences in the PTRY9 (Fig. 4), did not interfere expressively with its inhibitory and cytotoxic activities on highly invasive human breast cells (MDA.MB.231), in comparison to BTCl [39].

It is noteworthy that the main structural difference observed between both L and D peptides is the orientation of the disulfide bond (Cys1-Cys9). Indeed, the conformation of peptides and the position of the reactive site (Lys3) are very similar (Figs. 3 and 4). Additionally, as



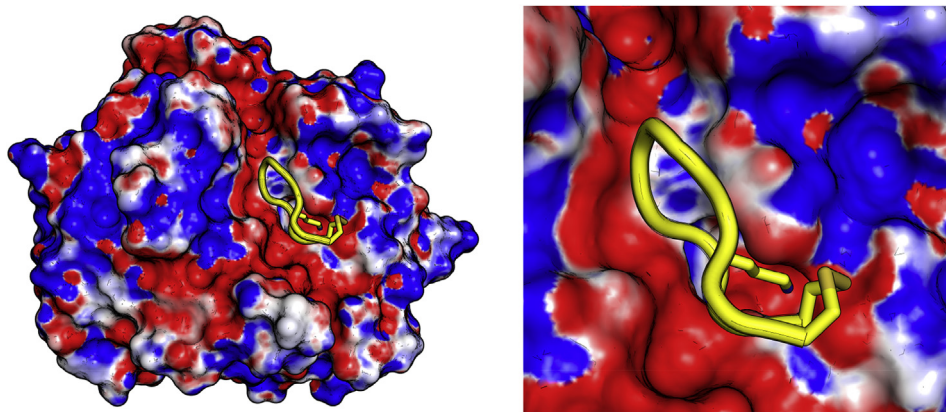
**Fig. 5.** The stereo view (cross-eyed) of PTRY9-trypsin complex. **A)** Stereo view of PTRY9 (cyan) bound to trypsin (gray). **B)** Stereo view depicting in yellow dashes all the intermolecular polar contacts in the PTRY9-L against trypsin interface (Table 2). Lys3 and Cys9 in PTRY9-L are labeled, and for clarity the side chains of residues not involved in polar contacts were not represented. **C)** Stereo view depicting in yellow dashes all the intermolecular polar contacts in the PTRY9-D against trypsin interface. Produced with PyMOL [49]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

seen in Table 2, the distances of the amino acid residues at the interface of the complex between trypsin and the L-PTRY9 and D-PTRY9 peptides are also very similar. Therefore, both L and D form of peptides could be responsible for the obtained results from inhibitory trypsin activity and cell viability assays.

In conclusion, the cyclic nonapeptide PTRY9 presented smaller affinity for trypsin than BTCI and exerted cytotoxic effects on

MDA.MB.231 invasive human breast cancer cells. The tridimensional structure of this peptide in complex with trypsin was solved at high resolutions of 1.15 and 1.61 Å and presented conformation and electrostatic complementarity at the binding site against trypsin, similar to that found for BTCI. Concerning the treatment of the invasive breast cancer, additional anticarcinogenic assays need to be further developed to investigate the biotechnological potential of PTRY9.





**Fig. 6.** Surface electrostatic potential of PTRY9-trypsin calculated from  $-5$  kT/e to  $+5$  kT/e and colored with a blue (positive) to red (negative) gradient. A) Trypsin bound to PTRY9. B) Detail of the interaction of PTRY9 in the negatively charged S1 pocket. Produced with PyMOL [49]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

### Author contribution statements

S.M.F., J.A.R.G.B. and M.M.V. conceived the original idea, planned the experiments and supervised all work. S.M.F., J.A.R.G.B., J.P.C.F., N.F.V. and A.M. wrote, reviewed and edited the manuscript. J.P.C.F., N.F.V. and J.A.R.G.B. conducted the crystallographic tasks. A.M. performed the cytotoxic effect experiment on breast cancer cells. C.B.F.M. and J.P.C.F. carried out the inhibitory assay of the peptide. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript elaboration.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), (grants nos. 423875/2016-7, 306132/2016-8, and 309054/2014-1), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Research Support Foundation of the Federal District (FAPDF) (grants nos. 193.001.533/2016 and 193.001.760/2017).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.013>.

### References

- [1] H. Neurath, Proteolytic processing and physiological regulation, *Trends Biochem. Sci.* 14 (7) (1989) 268–271.
- [2] G.J. Kato, Human genetic diseases of proteolysis, *Hum. Mutat.* 13 (2) (1999) 87–98.
- [3] J.N. Losso, The biochemical and functional food properties of the bowman-birk inhibitor, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48 (1) (2008) 94–118.
- [4] C. Lopez-Otin, C.M. Overall, Protease degradomics: a new challenge for proteomics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (7) (2002) 509–519.
- [5] B. Turk, Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (9) (2006) 785–799.
- [6] B. Turk, D. Turk, V. Turk, Protease signalling: the cutting edge, *EMBO J.* 31 (7) (2012) 1630–1643.
- [7] M. Laskowski, M.A. Qasim, What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477 (1) (2000) 324–337.
- [8] W. Bode, R. Huber, Structural basis of the endoprotease–protein inhibitor interaction. Dedicated to Prof. Dr. Hans Neurath on the occasion of his 90th birthday, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477 (1) (2000) 241–252.
- [9] O.L. Franco, R.C. dos Santos, J.A.N. Batista, A.C.M. Mendes, M.A.M. de Araújo, R.G. Monnerat, M.F. Grossi-de-Sá, S.M. de Freitas, Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*, *Phytochemistry* 63 (3) (2003) 343–349.
- [10] P.K. Lawrence, K.R. Koundal, Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects, *Electron. J. Biotechnol.* 5 (2002) 5–6.
- [11] Y. Birk, A. Gertler, S. Khalef, A pure trypsin inhibitor from soya beans, *Biochem. J.* 87 (1963) 281–284.
- [12] S. Odani, T. Ikenaka, Studies on soybean trypsin inhibitors. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor, *J. Biochem.* 74 (4) (1973) 697–715.
- [13] J.D. McBride, R.J. Leatherbarrow, Synthetic peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor protein, *Curr. Med. Chem.* 8 (8) (2001) 909–917.
- [14] J.D. McBride, E.M. Watson, A.B. Brauer, A.M. Jaulent, R.J. Leatherbarrow, Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop, *Biopolymers* 66 (2) (2002) 79–92.
- [15] A. Clemente, F.J. Moreno, M.d.C. Marín-Manzano, E. Jiménez, C. Domoney, The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean (Glycine max) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (3) (2010) 396–405.
- [16] A.R. Kennedy, P.C. Billings, P.A. Maki, P. Newberne, Effects of various preparations of dietary protease inhibitors on oral carcinogenesis in hamsters induced by DMBA, *Nutr. Canc.* 19 (2) (1993) 191–200.
- [17] G.A. Joanitti, R.B. Azevedo, S.M. Freitas, Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds, *Cancer Lett.* 293 (1) (2010) 73–81.
- [18] P.C. Billings, A.R. Newberne Pm Fau - Kennedy, A.R. Kennedy, Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine, *Carcinogenesis* 11 (7) (1990) 1083–1086.
- [19] D.V. Messadi, P. Billings, G. Shklar, A.R. Kennedy, Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor, *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 76 (3) (1986) 447–452.
- [20] W.B. Armstrong, T.H. Taylor, A.R. Kennedy, R.J. Melrose, D.V. Messadi, M. Gu, A.D. Le, M. Perloff, F. Civantos, W.J. Goodwin, L.J. Wirth, A.R. Kerr, F.L. Meyskens, Bowman-birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial, *Cancer Prev. Res.* 6 (5) (2013) 410.
- [21] D.R. Clark DA, N. Seidah, T.W. Moody, F. Cuttitta, T.P. Davis, Protease inhibitors suppress in vitro growth of human small cell lung cancer, *Lung Canc.* 11 (1) (1994) 130.
- [22] W.G. An, S.G. Hwang, J.B. Trepel, M.V. Blagosklonny, Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition, *Leukemia* 14 (2000) 1276.
- [23] F. Safavi, A. Rostami, Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases, *Exp. Mol. Pathol.* 93 (3) (2012) 428–433.
- [24] L. Morhy, M.M. Ventura, The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor, *An. Acad. Bras. Cienc.* 59 (0001–3765) (1987) 71–81.
- [25] S.M. de Freitas, L.V. de Mello, M.C.M. da Silva, G. Vriend, G. Neshich, M.M. Ventura, Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- $\alpha$ -chymotrypsin complex, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 409 (2) (1997) 121–127.
- [26] S. Luciano Paulino da, S.A.L. Jose Roberto, B. Carlos Jr., F. Sonia Maria de, Stability of a black eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor (BTCI), *Protein Pept. Lett.* 8 (1) (2001) 33–38.
- [27] M.M. Ventura, C.O. Martin, L. Morhy, A trypsin and chymotrypsin inhibitor form black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin, *An. Acad. Bras. Cienc.* 47 (1975) 335–346.
- [28] J.A.R.G. Barbosa, L.P. Silva, R.C.L. Teles, G.F. Esteves, R.B. Azevedo, M.M. Ventura, S.M. de Freitas, Crystal structure of the bowman-birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with  $\beta$ -trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases, *Biophys. J.* 92 (5) (2007) 1638–1650.
- [29] S.M. de Freitas, H. Ikemoto, M.M. Ventura, Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI), *J. Protein Chem.* 18 (3) (1999) 307–313.
- [30] M.K. Fachetti HCS, M.M. Ventura, Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor, *An. Acad. Bras. Cienc.* 56 (1984) 311–317.
- [31] G.D. Brand, D.A. Pires, J.R. Furtado Jr., A. Cooper, S.M. Freitas, C. Bloch Jr., Oligomerization affects the kinetics and thermodynamics of the interaction of a Bowman-Birk inhibitor with proteases, *Arch. Biochem. Biophys.* 618 (2017) 9–14.
- [32] A.F. Carvalho, M.S. Santos-Neto, H.S. Monteiro, S.M. Freitas, L. Morhy, N.R. Nascimento, M.C. Fonteles, BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects, *Braz. J. Biol.* 68 (1) (2008) 149–154.
- [33] A. da C.M. Alvares, E.F. Schwartz, N.O. Amaral, N.R. Trindade, G.R. Pedrino, L.P. Silva, S.M. de Freitas, Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides, *Molecules* 19 (11) (2014)

- 17536–17558.
- [34] J. Adams, V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, P.J. Elliott, Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res.* 59 (11) (1999) 2615–2622.
- [35] W.B. Armstrong, T.H. Taylor, A.R. Kennedy, R.J. Melrose, D.V. Messadi, M. Gu, A.D. Le, M. Perloff, F. Civantos, W.J. Goodwin, L.J. Wirth, A.R. Kerr, F.L. Meyskens Jr., Bowman birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial, *Cancer Prev. Res.* 6 (5) (2013) 410–418.
- [36] A. Clemente, M. Carmen Marin-Manzano, E. Jimenez, M. Carmen Arques, C. Domoney, The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk iso-inhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition, *Br. J. Nutr.* 108 (Suppl 1) (2012) S135–S144.
- [37] G.A. Joanitti, R.B. Azevedo, S.M. Freitas, Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds, *Cancer Lett.* 293 (1) (2010) 73–81.
- [38] L.daC. Souza, R. Camargo, M. Demasi, J.M. Santana, C.M. de Sa, S.M. de Freitas, Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells, *PLoS One* 9 (1) (2014) e86600.
- [39] A. Mehdad, G. Brumana, A.A. Souza, J. Barbosa, M.M. Ventura, S.M. de Freitas, A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition, *Cell Death Dis.* 2 (2016) 15067.
- [40] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (2) (1961) 271–278.
- [41] J. Van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: The MTT assay, *Methods Mol Biol.* 731 (2011) 237–245.
- [42] W. KabschXDS, *Acta Crystallogr. D* 66 (2) (2010) 125–132.
- [43] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (4) (2007) 658–674.
- [44] P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, P.D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, *Acta Crystallogr. D* 68 (4) (2012) 352–367.
- [45] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of coot, *Acta Crystallogr. D* 66 (4) (2010) 486–501.
- [46] I.W. Davis, A. Leaver-Fay, V.B. Chen, J.N. Block, G.J. Kapral, X. Wang, L.W. Murray, I.I.I.W.B. Arendall, J. Snoeyink, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids, *Nucleic Acids Res.* 35 (suppl\_2) (2007) W375–W383.
- [47] T. Gariani, R.J. Leatherbarrow, Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases, *J. Pept. Res.* 49 (6) (1997) 467–475.
- [48] N. Nishino, H. Aoyagi, T. Kato, N. Izumiya, Synthesis and activity of nonapeptide fragments of soybean Bowman-Birk inhibitor, *Experientia* 31 (1975) 410–412.
- [49] L.L.C. Schrodinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, (2015).