



Universidade de Brasília
Instituto de Biociências
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

MODIFICAÇÕES CONFORMACIONAIS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O SPCI E A α -QUIMOTRIPSINA

ADELSON JOEL DA SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Maria de Freitas

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

Brasília - 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a SONIA MARIA DE FREITAS (orientadora)

Laboratório de Biofísica Molecular
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília – UnB

Dr^o LUCIANO PAULINO DA SILVA (examinador)

Pesquisador da EMBRAPA/CENARGEM

Dr^a ROZENI CHAGAS LIMA TELES (examinadora)

Pesquisadora do CNPq
Laboratório de Biofísica Molecular
Universidade de Brasília - UnB

Prof^a Dr^a MARIANA SOUZA CASTRO (suplente)

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília - UnB

À minha doce mãezinha Ana Maria da Conceição Silva e querido pai Manoel Renato da Silva que me ensinaram o prazer pelo conhecimento, e que nunca estão distantes de minha alma.

Ao amor de minha vida Joseana Luisa de Freitas pelo amor, segurança e incentivo em momentos importantes de minha vida.

Ao meu irmão Ademilton César da Silva, com quem sempre posso contar.

À família Dallastra, Guidone e Elisa, a quem amo como irmãos.

À senhora Luiza Leontina pelo seu auxílio constante.

À Prof.^a Dr.^a Sonia M. de Freitas, pela oportunidade de aprender Biofísica Molecular sob uma orientação segura e entusiasta, pelo espírito de equipe que exemplifica e pelo sentimento humanitário que lhe é espontâneo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais mãezinha Ana Maria da Conceição Silva e Manoel Renato da Silva pelo amor presente em todos os momentos desta etapa acadêmica a me fortalecer e incentivar.

À minha companheira Joseana Luisa de Freitas que, desde o primeiro pensamento sobre mestrado na Universidade de Brasília (UnB), me confortou com suas palavras de apoio e carinho, tão importantes na minha vida. Apesar da distância nunca se esqueceu de mim e do quanto precisava de seu amor nos desafios necessários ao meu progresso intelectual.

Aos meus amigos Luiza Leotina, Guidone e Elisa Dallastra, pelo grande auxílio financeiro durante todo o curso. Essa ajuda foi essencial para que eu pudesse estudar e pesquisar com mais tranquilidade. Muito obrigado.

Aos amigos brasilienses senhor José Valdo e sua digna esposa, senhora Aldenice Cousseiro, pela apoio fraternal.

Ao amigo e cunhado solidário Marcos Roberto de Oliveira pela compreensão e decisiva ajuda em momentos difíceis.

Ao amigo e Prof^o Wendel e sua digna esposa senhora Luciana pela amizade sincera, palavras de apoio moral em momentos oportunos no curso deste trabalho.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Sonia Maria de Freitas pelo seu expressivo significado na minha vida. A sua gentileza e atenção desde minha chegada a Brasília, a compreensão de minha enorme ignorância a respeito da Biofísica Molecular, a confiança na minha capacidade de aprender, a segurança e seriedade na condução de minha aprendizagem, o entusiasmo em fazer ciência, a bondade e a alegria em mostrar a beleza do conhecimento de Biofísica Molecular em si mesma são características de sua personalidade, as quais foram alavancas no decorrer deste nível acadêmico. Professora, meu reconhecimento, gratidão e sincera amizade por tudo que fez e que ainda faz por mim.

À Dr^a Rozeni pela grande experiência nesta área, pela amizade e bondade dispensadas a mim, os quais contribuíram significativamente no decorrer desta pesquisa.

Ao convívio sempre enriquecedor da Gisele (doutoranda) e do Cristiano (mestrando) que muito me ajudaram com suas explicações, sugestões e experiências para que eu pudesse melhor assimilar os conhecimentos e o ritmo de trabalho da equipe de pesquisa da Dr^a Sonia M. Freitas.

À Larissa e Muriele pela amizade e convivência. Larissa, obrigado pelos momentos de discussão e aprendizagem, pelas conversas, alegria e presença ativa no laboratório.

Aos técnicos responsáveis pelo Laboratório de Biofísica Molecular senhores Francisco e Lucas pelo apoio técnico. “Chiquinho” muito obrigado pela sua atenção à minha pessoa e sua bondade nas horas mais desafiadoras.

A todos os alunos que chegaram depois e que compõem hoje a equipe da Dr^a Sonia Freitas: Alice (mestranda), Sandrielle, Everton e Viviane. Por todos os momentos agradáveis e enriquecedores, muito obrigado.

Aos meus amigos Gabriel e Flávia, companheiros de trabalho no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, SP). A amizade de vocês muito me ajudou.

À Diana (Colômbia), Jimmy (Colômbia) e Rafael pela amizade de todos vocês.

Aos meus amigos de Mato Grosso Prof^o Dr^o Marcos André de Carvalho, Josué Ribeiro da Silva Nunes, Jean Marc e Nazaré Urquiza por acreditarem e mostrarem que sou capaz de vencer os desafios da distância e da inteligência.

Aos amigos Sandro e sua digna esposa senhora Karen que com sua amizade e simplicidade fazem parte das minhas amizades mais caras.

Ao amigo senhor Nonato (Gerente dos Apartamentos para Professores da UnB, Colina) e às queridas amigas da Colina (UnB)

senhoras Verônica e Maria pela recepção quando da minha chegada em Brasília e ainda hoje.

Ao Eder e sua digna esposa senhora Isabel pelos momentos de distração, convivência e cultura.

À senhorita Ana Carolina L. S. Goulart pela gentileza em melhorar um pouco mais meu entendimento da língua inglesa.

À senhorita Adriana Reis dos Santos pela gentileza na impressão do material definitivo.

Ao LNLS por tornar possível a execução dos experimentos de tempo de vida de fluorescência e cristalização de proteínas, em especial ao pesquisador-colaborador Dr^o João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa pelo apoio na execução destes experimentos.

Ao Dr^o Fábio Antonio Schaberte pelo acompanhamento no uso da fonte de luz síncrotron para realização dos experimentos de tempo de vida de fluorescência, amizade e gentileza com que nos atendeu no LNLS.

Às Celisa e Andréia pela atenção e gentileza no apoio técnico no LNLS.

Ao Professor Emérito da Universidade de Brasília Dr^o Manuel M. Ventura pelo curso de fluorescência, dada com profundidade, segurança e entusiasmo, relatando suas experiências científicas enriquecedoras que me incentivou consideravelmente.

À Dr^a Rozeni Chagas Limas Teles (Laboratório de Biofísica Molecular), Dr^o Luciano Paulino da Silva (EMBRAPA/CENARGEM) e Prof^a Dr^a Mariana Souza Castro (Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas) por aceitaram gentil e prontamente o convite de participarem da Banca Examinadora desta defesa de dissertação de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília pela excelente qualidade do programa na avaliação do CAPES.

Ao CAPES pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo.

A todos que estavam presentes na minha defesa do mestrado e aqueles tantos que contribuíram de forma indireta na minha formação, muito obrigado.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SPCI = Inibidor de quimotripsina de *Schizolobium parahyba*

DrTI = Inibidor de tripsina de *Delonix regia*

ETI = Inibidor de tripsina de *Erythrina variegata*

CTI = Inibitor de tripsina de *Copaifera langsdorff*

WCI = Inibidor de quimotripsina de feijão

KTI = Inibidor de tripsina Kunitz

AeTI = Inibitor de tripsina de *Archidendron ellipticum*

PdKI-2 = Inibidor de tripsina e papaína de *Pithecelobium dumosum*

AceKI = Inibidor de tripsina, quimotripsina e elastase de *Ancystoma ceylanicum*

BTCl = Inibidor de quimotripsina e tripsina de feijão de corda

TCA = Ácido tricloroacético

ELD = Espalhamento de luz dinamica

DTT = Ditioneitol

Sbn = Sobrenadante

Plt = Precipitado

K_{SV} = Constante de Stern-Volmer

K_S = Constante de atenuação estática

K_D = Constante de atenuação dinâmica

F₀ = Intensidade de fluorescência da ausência de atenuador

F = Intensidade de fluorescência na presença de atenuador

τ_0 = Tempo de vida na ausência de atenuador

τ = Tempo de vida na presença de atenuador

$\langle \tau \rangle$ = Tempo de vida médio

f = Contribuição fracional da intensidade de fluorescência

χ^2 = "Chi-quadrado"

f_Q = Eficiência de atenuação

K_q = Constante de atenuação bimolecular

K₀ = Constante da taxa bimolecular de difusão controlada

K_i = Constante de inibição

N = Número de Avogadro

R = Soma dos raios colisionais

R_f = Raio colisional do fluoróforo

R_q = Raio colisional do atenuador

D = Soma dos coeficientes de difusão

D_f = Coeficiente de difusão do fluoróforo

D_q = Coeficiente de difusão do atenuador

η = Viscosidade

RESUMO

O inibidor de quimotripsina de *Schizolobium parahyba* (SPCI) pertence à família Kunitz, inibindo especificamente quimotripsina na proporção molar de 1:1 ($K_i = 5,85 \times 10^{-8}$ M). Este trabalho visa analisar as modificações conformacionais resultantes da associação entre o SPCI e a α -quimotripsina por meio de métodos espectroscópicos de fluorescência (estacionária e dinâmica), dicróismo circular e espalhamento de luz dinâmica (ELD); a cristalização do complexo binário SPCI-quimotripsina também foi realizada utilizando o método da matriz esparsa em gota sentada. O SPCI foi purificado pela precipitação com ácido tricloroacético 1,2% seguido por cromatografia de troca catiônica. A purificação do complexo binário foi realizada por cromatografia de exclusão molecular. O espectro da emissão na interação das moléculas apresentou atenuação da intensidade da fluorescência fixa a $\lambda_{\max} = 332$. O gráfico de Stern-Volmer apresentou K_{SV} (10^3 M^{-1}) praticamente constante em diferentes temperaturas, excluindo a hipótese de atenuação estática ou dinâmica. O decaimento de fluorescência do SPCI ($\tau_1 = 0,67$ ns e $f_1 = 0,52$; $\tau_2 = 4,98$ ns e $f_2 = 0,45$) e da α -quimotripsina ($\tau_1 = 0,88$ ns e $f_1 = 0,37$; $\tau_2 = 4,16$ ns e $f_2 = 0,67$) foram melhores ajustadas pelo modelo *Discreto* e *Planck* para dois tempos de vida baseado no valor mínimo do χ^2 . Os parâmetros obtidos indicam que a α -quimotripsina apresenta duas populações distintas de triptofano: enterrada (τ_1) e exposta (τ_2); o decaimento bi-exponencial encontrado para o SPCI indica subestados conformacionais do triptofano no estado excitado. A interação do inibidor com a quimotripsina foi analisada através da clássica equação de Stern-Volmer. A interação provocou modificações conformacionais nos micro-ambientes dos triptofanos do complexo, aumentando (redução da hidrofobicidade) e atenuando (aumento da hidrofobicidade) o tempo de vida. Essa modificação foi dependente da concentração da enzima. Os cálculos para K_q ($10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mostraram que a atenuação registrada pela fluorescência estacionária e dinâmica ocorre por ligação molecular. Os experimentos de ELD mostraram que o SPCI apresenta forma monomérica em solução, independente da concentração, pH e temperatura. Portanto, a atenuação do tempo de vida do complexo é devido provavelmente a estados oligoméricos mais complexos (tetrâmero) da enzima. A presença de NaCl 0,2 M reduziram os valores do tempo de vida para ambas as

moléculas separadamente, provavelmente pela redução das interações dos triptofanos com os resíduos circunvizinhos. O sal potencializou a atenuação do tempo de vida acima de 20 μM da enzima. A análise do papel das ligações dissulfeto na interação também foi realizada. O gráfico de Stern-Volmer mostrou flutuação ao longo da titulação da quimotripsina, sugerindo flexibilidade conformacional do SPCI nessas condições. A desnaturação térmica do inibidor não foi possível, mostrando que as ligações dissulfeto não são responsáveis pela estabilidade estrutural do inibidor. As reduções dessas ligações promoveram modificações em valores percentuais na estrutura secundária, o que poderá explicar a flexibilidade conformacional registrada na flutuação gráfica de Stern-Volmer. O cristal do complexo binário do SPCI com α -quimotripsina difratando a 2,8 Å foi obtido na condição MES/NaOH 100 mM pH 5.5, PEG 6000 20% (w/v), LiCl₂ 200 mM e sulfobetaina não-detergente 201 (NDSB-201) como aditivo.

Palavras chave: interação molecular, inibidor de quimotripsina de *Schizolobium parahyba* (SPCI), tempo de vida de fluorescência, dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmica, cristalização do complexo binário SPCI-quimotripsina.

ABSTRACT

The *Schizolobium parahyba* chymotrypsin (SPCI) is a Kunitz-type inhibitor. It inhibits the chymotrypsin by forming a stable complex of 1:1 stoichiometry ($K_i = 5.85 \times 10^{-8}$ M). The goal of this work is to analyze the conformational modifications of the association between SPCI and α -chymotrypsin by the fluorescence (steady-state and dynamic), circular dichroism and dynamic light scattering (ELD) spectroscopy methods. The SPCI-chymotrypsin complex crystallization was made by sitting-drop vapour-diffusion method. The SPCI was purified by the trichloroacetic acid (TCA) 1,2% precipitation following ion-exchange chromatography. The binary complex was purified by molecular exclusion chromatography. The emission spectrum of the SPCI-chymotrypsin interaction has displayed a fluorescence intensity quenching ($\lambda_{\max} = 332$ nm). The Stern-Volmer graphic displayed a k_{sv} (10^3 M^{-1}) unaltered in different temperatures, excluding the static or dynamic quenching hypotheses. The fluorescence lifetime of the SPCI ($\tau_1 = 0,67$ ns e $f_1 = 0,52$; $\tau_2 = 4,98$ ns e $f_2 = 0,45$) and α -chymotrypsin ($\tau_1 = 0,88$ ns e $f_1 = 0,37$; $\tau_2 = 4,16$ ns e $f_2 = 0,67$) were best adjusted by the *Discrete* or *Planck* models for two lifetimes based in the minimal value of the χ^2 . The parameters indicated that the α -chymotrypsin has displayed two different populations of tryptophan: buried (τ_1) and exposed (τ_2); the bi-exponential decay encountered for the SPCI indicates conformacional substates of the tryptophan in the excited state. The SPCI-chymotrypsin interaction was analyzed by the Stern-Volmer equation. The interaction provoked conformacional modification in the complex tryptophan environment, by increasing (decrease hydrophobicity) and by quenching (increase hydrophobicity) the complex lifetime. These modifications were dependent on the concentration of that enzyme. The k_q ($10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) showed that stationary and dynamic quenching is due to molecular liaison. The ELD experiments have showed that the SPCI displays monomeric form in solution, independently of its concentration, pH and temperature. Therefore, the complex lifetime quenching is probably due to more complex oligomeric states (tetramer) of that enzyme. The 0,2 M NaCl decreased the lifetime of both molecules. This is probably due to the decrease in the tryptophans interactions with the environment residues. The salt increased the lifetime quenching above 20 μM of the enzyme. The role of disulfide bonds was also observed. The Stern-Volmer graphic

showed fluctuation along the chymotrypsin titration, suggesting conformational flexibility of SPCI in such conditions. The thermal denaturation of the inhibitor was not possible. That indicates the disulfide bonds are not responsible for the structural stability of SPCI. The reduction of the disulfide bonds caused modifications in the secondary structure of the SPCI, which can be explained by the conformational flexibility recorded by the Stern-Volmer graphic fluctuation. The binary complex crystal with a diffraction of 2.8 Å was obtained in 100 mM MES–NaOH pH 5.5, 20%(w/v) PEG 6000, 200 mM LiCl as precipitant and 200 mM nondetergent sulfobetaine molecular weight 201 Da (NDSB-201) as an additive.

Key-words: molecular interaction, *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor (SPCI), fluorescence lifetime, circular dichroism, dynamic light scattering, SPCI-chymotrypsin binary complex crystallization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema das etapas da reação entre inibidor-enzima (modificado de Dasgupta *et al.*, 2006).....10
- Figura 2. (a)** Estrutura tridimensional do inibidor de quimotripsina de feijão (WCI), uma proteína com motivo β -trofoil pertencente à família Kunitz e **(b)** representação estereoscópica das interações de ligação de hidrogênio feita pelo resíduo Asn14 do “scaffold” com os resíduos da alça do sítio reativo em WCI. (modificado de Dasgupta *et al.*, 2006).....10
- Figura 3.** Diagrama da produção de extrato bruto. Protocolo desenvolvido por Souza *et al.* (1995).....18
- Figura 4.** Gel de poliacrilamida a 13% do EB do SPCI. **sbn-1 e plt-1**, sobrenadante e precipitado após extração das proteínas em NaCl 1 %; **sbn-2 e plt-2**, sobrenadante e precipitado após extração em NaCl 1%; **sbn-3 e plt-3**, sobrenadante e precipitado após precipitação com sulfato de amônio a 60%; **sbn-4 e plt-4**, sobrenadante e precipitado após precipitação por sulfato de amônio a 70% (ver Materiais e Métodos). A seta indica a banda correspondente ao SPCI. **M**, marcador de massa molecular: somatotropina bovina recombinante: 20 kDa (Schering Plough)..31
- Figura 5.** Gel de poliacrilamida 13% das amostras de SPCI semi-purificado. O sobrenadante e o precipitado obtidos da precipitação por TCA estão mostrados em **A** e **B**, respectivamente. Linha 1: amostras precipitadas com TCA 0,2%; linha 2: amostras precipitadas com TCA 0,4%; linha 3: amostras precipitadas com TCA 0,6% de; linha 4: amostras precipitadas com TCA 0,8%; **M**, marcador de massa molecular: 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa (BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen; Cat. Nº. 10747-012); linha 5: amostras precipitadas com TCA 1,0%; linha 6: amostras precipitadas com TCA 1,2% de TCA; linha 7: amostras precipitadas com TCA 1,4%; linha 8: amostras precipitadas com TCA 1,6%.....32
- Figura 6. (A)** Cromatograma da amostra de SPCI semi-purificado em coluna SP-Sephadex C₂₅₋₁₂₀. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl. A seta indica o pico em que o SPCI foi eluído puro. **(B)** Perfil eletroforético SDS-PAGE 13% da purificação do SPCI por cromatografia de troca iônica. Linhas 1 e 2: frações de maior absorvância (SPCI puro). Linha 3: marcador de massa molecular: fosforilase b do músculo de rato (97,4 kDa), albumina do soro bovino (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1) e α -lactoalbumina de leite bovino (14,2 kDa) (Amersham Pharmacia Biotech UK).....32
- Figura 7. (A)** Cromatograma do complexo binário SPCI-quimotripsina por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G₇₅. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50

mM KCl 0,2 M pH 7,6. O primeiro pico corresponde ao complexo binário e o segundo ao SPCI e a quimotripsina nas formas livres. O fluxo foi de 2,5 mL.tubo⁻¹. **(B)** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 13% do complexo SPCI-quimotripsina. Linhas 1 e 3: fração de maior absorvância. Linha 2: marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia Biotech UK): fosforilase b do músculo de rato (97,4 kDa), albumina do soro bovino (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1) e α -lactoalbumina de leite bovino (14,2 kDa).....**33**

Figura 8. Espectros de emissão de fluorescência de α -quimotripsina com concentrações crescentes do SPCI, em várias temperaturas. (a) Espectros de emissão de fluorescência da α -quimotripsina com: (b) 0,043; (c) 0,087; (d) 0,13; (e) 0,215; (f) 0,299; (g) 0,382; (h) 0,463; (i) 0,543; (j) 0,622; (l) 0,7; (m) 0,776; (n) 0,856; (o) 0,926 e (p) 1 μ M de SPCI. **X** é o espectro de fluorescência do tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl₂ 50 mM.....**34**

Figura 9. Gráfico de Stern-Volmer para a interação SPCI com α -quimotripsina. F₀ e F são as intensidade de fluorescência do inibidor na ausência e presença da enzima, respectivamente.....**35**

Figura 10. Modulação e fase multifrequencial do SPCI 50 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl₂ 50 mM ajustados em diferentes modelos. Os ajustes para o modelo *Planck* são praticamente idênticos aos do *Discreto*.....**36**

Figura 11. Modulação e fase multifrequencial da α -quimotripsina em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl₂ 50 mM ajustados em diferentes modelos. Os ajustes para o modelo *Planck* são idênticos aos do *Discreto*.....**38**

Figura 12. Modulação e fase multifrequencial para a interação do SPCI com a α -quimotripsina em diferentes modelos. Estes ajustes obtidos advêm apenas da primeira titulação (adição de 1 μ L da α -quimotripsina na solução de SPCI, equivalendo a 1,85 μ M da enzima na solução). O modelo *Planck* apresentou ajustes e valores idênticos aos do modelo *Discreto*, por isso não está mostrado na figura. Os ângulos de fase e as frações de modulação estão apresentados como uma função da modulação de frequência a 25°C.....**40**

Figura 13. Modulação e fase para a interação do SPCI com a α -quimotripsina em diferentes modelos. Estes ajustes obtidos advêm apenas da última titulação (adição de 25 μ L da α -quimotripsina na solução de SPCI, equivalendo a 50 μ M da enzima na solução). O modelo *Planck* apresenta ajustes e valores idênticos ao do *Discreto*, por isso não está apresentado na figura. Os ângulos de fase e as frações de modulação estão apresentados como uma função da modulação de frequência a 25°C.....**41**

- Figura 14.** Gráfico de Stern-Volmer apresentando os dados da interação do SPCI com a quimotripsina a 25°C. A solução de SPCI está fixada em 50 μ M. A representação da atenuação do tempo de vida (parte ascendente do gráfico) está mostrada no gráfico superior à direita, conforme equação de Stern-Volmer ($R^2 = 0,99$). τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e presença da enzima.....**43**
- Figura 15.** Gráfico de Stern-Volmer. SPCI 100 μ M em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6 CaCl₂ 50mM com NaCl 0,2M a 25°C. A representação da atenuação do tempo de vida (20 μ M a 32 μ M da enzima) está mostrada no gráfico superior à direita, conforme equação de Stern-Volmer ($R^2 = 0,98$). τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e presença da enzima.....**44**
- Figura 16.** Gráfico de Stern-Volmer. O SPCI a 100 μ M foi dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM contendo CaCl₂ 50 mM e NaCl 0,2M com suas ligações dissulfeto reduzidas (DTT 2mM). τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e presença da α -quimotripsina.....**45**
- Figura 17.** Espectros de dicroísmo circular “distante do UV” do SPCI em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl₂ 0,2 M e DTT 2 mM. A melhor concentração do inibidor (HT[V] < 700) para realizar o experimento foi de 0,073 mg.mL⁻¹**46**
- Figura 18.** Desnaturação térmica de SPCI com as ligações dissulfeto reduzidas. SPCI 0,073 mg.mL⁻¹ em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M e DTT 2 mM. Comprimento de onda fixado em 201 nm.....**47**
- Figura 19.** Espectros de dicroísmo circular “distante do UV” do SPCI na forma nativa em tampão Hepes 2 mM pH 7,5. A tabela inserida mostra a percentagem das estruturas secundárias a 25°C.....**47**
- Figura 20.** Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI, variando a concentração.....**49**
- Figura 21.** Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula, variando a concentração. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.....**49**
- Figura 22.** Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI, variando temperatura.....**55**

- Figura 23.** Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula variando a temperatura. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.....**52**
- Figura 24.** Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmica da solução de SPCI, variando pH.....**54**
- Figura 25.** Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula variando o pH. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.....**55**
- Figura 26.** Sistema robotizado do LNLS utilizado para a realização da etapa inicial de cristalização.....**56**
- Figura 27.** Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina obtidos na etapa inicial de cristalização utilizando o robô do LNLS. **A**, Cristais nos poços das placas de cristalização feitas pelo robô. **B**, Aumento da imagem do primeiro cristal (**A**, superior). Os cristais apresentaram difrataram a 4,0 Å.....**56**
- Figura 28.** Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina obtidos na condição A2 (NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6 10 mM contendo PEG 6000 20% e ZnCl₂ 10 M) pelo sistema robotizado do LNLS. Esses cristais difrataram a 3,8 Å.....**57**
- Figura 29.** Cristais do complexo binário de SPCI obtidos em placas de cristalização manual nas condições A2 a A4. Estes cristais difrataram a 3,4 Å.....**58**
- Figura 30.** Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina crescidos na presença de aditivo. Esse cristal cresceu na condição MES-NaOH a 0,1 M pH 5.5 contendo PEG 6000 a 20% (w/v) e 0,2 M de LiCl₂ e o aditivo de sulfobetaína não detergente 201 a 2,0 M (NDSB-201) e difratou a 2,8 Å.....**59**
- Figura 31.** Cristais do complexo binário de SPCI-quimotripsina que cresceram em aditivos. Estes cristais serão submetidos à difração por raios-X para coleta de dados.....**60**

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Constantes de atenuação de fluorescência de Stern-Volmer para a interação SPCI com α -quimotripsina em diferentes temperaturas.....	35
Tabela II. Análise do tempo de vida de fluorescência do SPCI a 50 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM, utilizando diferentes modelos de ajuste.....	37
Tabela III. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da α -quimotripsina. A enzima (50 μ M) foi mantida no mesmo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM.....	39
Tabela IV. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da interação SPCI-quimotripsina da primeira titulação.....	42
Tabela V. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da interação SPCI-quimotripsina da última titulação.....	42
Tabela VI. Porcentagem das estruturas secundárias do SPCI (0,073 mg.mL ⁻¹) em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M e DTT 2 mM.....	46
Tabela VII. Dados de espalhamento de luz dinâmica da solução de SPCI em tampão Tris-HCl 50 mM contendo CaCl_2 50 mM pH 7,6, variando a concentração, a 25°C.....	48
Tabela VIII. Análise dos dados ajustados de ELD do SPCI em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl_2 50 mM pH 7,6 a 25°C sob variação da concentração.....	50
Tabela IX. Espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI a 50 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com a variação da temperatura.....	51
Tabela X. Análise dos dados de ELD ajustados (Borgstahl, 2007) do SPCI a 50 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com variação da temperatura.....	53
Tabela XI. Dados de ELD da solução de SPCI a 50 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com variação pH. O desvio padrão destes dados pode ser visto na figura 24.....	53
Tabela XII. Análise dos dados de ELD ajustados (Borgstahl, 2007) do SPCI variando o pH, a 25°C.....	54

Tabela XIII. Condições que apresentaram cristais aparentemente adequados para submeter à difração por raios-X.....**57**

Tabela XIV. Aditivos do kit Hampton Research que resultaram em cristais na condição C1.....**59**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Proteases: conceito e classificação.....	01
1.2. Serinoproteinases.....	02
1.3. Inibidores de serinoproteinases.....	04
1.3.1. Conceito e classificação.....	04
1.3.2. Relevância dos inibidores da família Kunitz.....	05
1.3.3. Estrutura e mecanismo de inibição dos membros da família Kunitz.....	09
1.4. Inibidor de quimotripsina de <i>Schizolobium parahyba</i> SPCI.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Obtenção das sementes e do extrato bruto.....	18
4.2. Purificação do SPCI e do complexo binário.....	19
4.3. Variações conformacionais do SCPI em associação com α- quimotripsina.....	20
4.3.1. Espectroscopia de fluorescência estacionária.....	20
4.3.2. Espectroscopia de fluorescência dinâmica.....	21
4.4. Estabilidade conformacional - desnaturação térmica.....	23
4.5. Cristalização do complexo binário.....	26
4.6. Coleta de dados cristalográficos.....	27
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Purificação do SPCI e do complexo binário.....	31
5.2. Alterações conformacionais do SPCI com α-quimotripsina.....	33
5.2.1. Fluorescência estacionária.....	33
5.2.2. Fluorescência dinâmica.....	35
5.3. Estabilidade estrutural do SPCI.....	45
5.4. MEDIDAS DO ESTADO DE AGREGAÇÃO DO INIBIDOR EM SOLUÇÃO.....	48

5.5. CRISTALIZAÇÃO DO COMPLEXO BINÁRIO E COLETA DOS DADOS.....	56
6. DISCUSSÃO.....	61
6.1. Purificação do SPCI e do complexo binário.....	61
6.2. Modificações conformacionais do SPCI e quimotripsina na formação do complexo binário.....	62
6.2.1. Alterações no micro-ambiente dos triptofanos monitoradas por fluorescência estacionária.....	62
6.2.2. Ambientes moleculares dos triptofanos pela análise do tempo de vida de fluorescência.....	63
6.2.3. Análise do decaimento bi-exponencial da fluorescência do SPCI.....	68
6.2.4. Análise dos estados oligoméricos do SPCI.....	71
6.2.5. Interação do SPCI com a α -quimotripsina, com as ligações dissulfeto do inibidor preservadas.....	73
6.2.6. Interação do SPCI nativo com a α -quimotripsina em solvente salino.....	75
6.2.7. Interação do SPCI com a α -quimotripsina, com as ligações dissulfeto do inibidor reduzidas.....	77
6.3. Cristalização do complexo binário.....	78
7. CONCLUSÃO.....	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
9. ANEXO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	91
9.1. Espectroscopia de fluorescência.....	91
9.1.1. Medidas de fluorescência.....	91
9.1.2. Tempo de vida de fluorescência.....	91
9.1.3. Atenuação dinâmica ou colisional.....	93
9.1.4. Atenuação estática.....	96
9.1.5. Combinação de ambos os tipos de atenuação.....	98
9.2. Espalhamento de luz dinâmica.....	98
9.3. Cristalização.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteases: conceito e classificação

As proteases foram identificadas inicialmente no século XIX como enzimas que participavam das vias centrais de degradação de proteínas. Posteriormente, na década de 30, surgiu um sistema de nomenclatura para essas enzimas devido à necessidade de distinguir as hidrolases que atuavam sobre as proteínas e as que atuavam sobre os peptídeos. Assim, dois sistemas foram propostos: as proteases que atuavam sobre proteínas foram denominadas proteinases e aquelas que atuavam sobre peptídeos foram denominadas peptidases. As peptidases correspondiam a um termo genérico de peptídeo hidrolase e poderiam ser subdivididas em exopeptidases e endopeptidases (Bergmann e Ross, 1936).

Atualmente, as proteases, também conhecidas por peptidases, são enzimas com atividade hidrolítica de ligações peptídicas, conforme definida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (IUB Nomenclature Committee, 1984). Essas enzimas compreendem as exopeptidases e as endopeptidases, também conhecidas como proteinases. As primeiras não apresentam restrição, podendo catalisar a clivagem de ligações peptídicas posicionadas tanto no centro quanto nas extremidades da cadeia polipeptídica. O segundo grupo catalisa a clivagem de ligações peptídicas em sítios específicos da seqüência primária, removendo os aminoácidos das regiões N e C terminais, em direção ao centro da cadeia polipeptídica (Barrett e Salvesen, 1986). A conceituação e a classificação dessas enzimas ainda são mantidas nos dias atuais.

As proteinases são divididas em quatro classes diferentes de acordo com os seus mecanismos catalíticos, já conhecidos: serinoproteinases, cisteinoproteinases, aspartoproteinases e metaloproteinases (Barrett, 1980). As evidências estruturais e funcionais atribuídas a estas proteinases e o mecanismo de ação de cada uma delas foram as principais características que levaram alguns autores a enquadrá-las em uma grande família, que provavelmente teria originado de um mesmo gene ancestral que sofreu modificações ao longo do processo evolutivo divergente (Dayhoff *et al.*, 1983).

Entre as quatro classes de proteinases, as serinoproteinases são as mais utilizadas e estudadas nos sistemas vivos. As serinoproteinases são amplamente distribuídas na natureza, apresentando duas principais famílias representadas pela subtilisina e quimotripsina (Kraut, 1977), ambas apresentando estruturas tridimensionais diferentes, todavia com a mesma geometria do sítio ativo. As enzimas da família subtilisina são encontradas apenas em bactérias, enquanto as da quimotripsina são encontradas tanto em procariotos quanto em microorganismos eucariotos, plantas e animais (invertebrados e vertebrados), compreendendo enzimas como a quimotripsina, tripsina, elastase e kallicreína (Hartley, 1970; James, 1976).

1.2. Serinoproteinases

As serinoproteinases compreendem um grupo de enzimas proteolíticas envolvidas em uma série de eventos fisiológicos, tais como coagulação sanguínea, ativação do complemento, ativação de peptídeos, processo digestivo, reprodução e fibrinólise, ação sobre hormônios, fagocitose, ovulação e fertilização (Neurath, 1984).

Os aminoácidos que formam a ligação peptídica a ser hidrolisada por essas enzimas são designados como P_1-P_1' . Os outros resíduos, que interagem com a enzima na região de especificidade, são denominados como P_4-P_2 (região N-terminal) e como $P_2'-P_4'$ (região C-terminal). Os resíduos do sítio de ligação ao substrato da enzima são denominados de sub-sítios "S", que obedecem à mesma numeração dos resíduos do substrato, variando de S_4 a S_4' (Schechter e Berger, 1967).

Dentre as enzimas que constituem as serinoproteinases, três delas são destacadas: tripsina, que cliva substratos com resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys e Arg) em P_1 ; α -quimotripsina, que clivam substrato com resíduos aromáticos ou cadeias laterais alifáticas grandes; e elastase, que cliva substratos com cadeias laterais alifáticas pequenas (Kraut, 1977; Steitz e Shulman, 1982).

O sítio ativo de uma serinoproteinase é composto de duas regiões distintas: o sítio catalítico e o sítio de ligação do substrato. A maioria destas moléculas interage

com ambas as regiões. O sítio catalítico é constituído de Ser195, His57 e Asp102, de acordo com a seqüência dos resíduos da α -quimotripsina. Estes três resíduos formam um sistema de ligações de hidrogênio com o substrato e são conhecidos como tríade catalítica (Kraut, 1977; Steitz e Shulman, 1982).

A α -quimotripsina foi uma das primeiras serinoproteinases a ter sua estrutura tridimensional resolvida. Desde então, várias estruturas de serinoproteinases complexadas com inibidores peptídicos e polipeptídicos endógenos têm sido resolvidas. Essa enzima apresenta dois domínios, cada um deles contendo cerca de 120 aminoácidos. Os dois domínios são do tipo barril- β , consistindo de seis fitas β -antiparalelas que apresentam a mesma topologia: um motivo de “chave grega” (fitas 1-4) seguido por um motivo de “grampo anti-paralelo” (fitas 5 e 6) (Branden e Tooze, 1991).

O sítio ativo em α -quimotripsina é uma fenda com a acomodação para uma cadeia lateral planar e aromática. A fenda específica para a tripsina é similar, com a diferença que a Ser189 no fundo da fenda é substituída por um Asp189. Conseqüentemente, Phe ou Leu (quimotripsina) e Lys ou Arg (tripsina) são estabilizados quando se ligam à fenda. Na elastase, a fenda específica S_1 é parcialmente ocluída pela cadeia lateral de uma Val226 e uma Thr216, deixando um pequeno espaço para a interação específica para P_1 com pequenas cadeias laterais. As serinoproteinases possuem regiões extensas específicas para a ligação do substrato. A porção de S_1 - S_3 corresponde aos resíduos 214-216 (quimotripsina) que podem formar três ligações de hidrogênio com a estrutura folha β -antiparalela da cadeia principal do substrato ou inibidor, formando uma região de ligação não específica que contribui para a estabilização do complexo formado em uma etapa intermediária, anterior à clivagem da ligação peptídica (Kraut, 1977; Steitz e Shulman, 1982).

As famílias de serinoproteinases e seus inibidores protéicos naturais estão dentre os modelos mais estudados de reconhecimento proteína-proteína. Os inibidores apresentam potencial para a regulação das atividades proteolíticas de vias específicas que envolvem essas proteinases (Otlewski *et al.*, 1999; Ascenzi *et al.*, 2003).

1.3. Inibidores de serinoproteinases

1.3.1. Conceito e classificação

Os inibidores caracterizam-se por ligar a uma determinada enzima e promoverem um declínio na taxa de clivagem do substrato. (Barrett e Salvesen, 1986). O estudo dos inibidores teve início na década de 30, sendo que o marco inicial ocorreu com o trabalho de Kunitz com a purificação de um inibidor de tripsina isolado de soja e de pâncreas bovino (Kunitz e Northrop, 1936; Kunitz, 1946). Desde então, vários trabalhos sobre purificação de inibidores de proteases têm sido publicados, em diversas áreas do conhecimento. Houve um crescimento no interesse de muitos autores em virtude da simplicidade de obtenção destas proteínas, da sua relativa estabilidade conformacional e da importância destes inibidores sob ponto de vista fisiológico, farmacológico e nutricional (Freitas, 1996).

Os inibidores de serinoproteinases são classificados em 18 famílias, baseado na seqüência de aminoácido, similaridade estrutural e mecanismo de reação com sua respectiva enzima (Laskowski e Qasim, 2000). As duas principais famílias de inibidores de leguminosas têm sido bem caracterizadas, conhecidos por inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (Laskowski e Kato, 1980; Valueva e Mosolov, 1999). Estas duas famílias de inibidores diferem principalmente quanto à massa molecular, conteúdo de ligações dissulfeto, estrutura tridimensional e estabilidade à temperatura e agentes desnaturantes (Laskowski e Kato, 1980; Bode e Huber, 2000).

Os inibidores do tipo Bowman-Birk, cuja massa molecular varia de aproximadamente 8 a 10 kDa, com alto conteúdo de cisteína e dois sítios reativos (Richardson, 1991), são assim chamados pelo fato do primeiro inibidor dessa família ter sido isolado de *Glycine max* (soja) por Bowman em 1946 e, posteriormente, caracterizado por Birk *et al.* (1963). Independentes entre si, os sítios reativos formam complexos com duas moléculas, ambas de tripsina, ou com tripsina e quimotripsina, como os isolados de *Phaseolus lunatus* (feijão de lima), *Glycine max* (soja), *Vigna unguiculata* (feijão de corda) e *Phaseolus angularis* (feijão azuki) (Yoshida e Yoshikawa, 1975).

Os membros da família Kunitz são abundantes na família Leguminosae, embora tenham sido descritos em outras famílias de plantas, como Solanaceae (batata e tomate) e Gramineae (trigo) (Richardson, 1991). Tais inibidores são proteínas com massa molecular variando de aproximadamente 18 a 24 kDa, apresentando uma ou duas cadeias polipeptídicas, baixo conteúdo de resíduos de cisteína (frequentemente com quatro resíduos de cisteína em duas ligações dissulfeto) e um único sítio reativo (Macedo *et al.*, 2000). Os inibidores que possuem duas cadeias, α (16 kDa) e β (5 kDa) ligadas por ligações dissulfeto, parecem estar restritos à subfamília Mimosidae (Richardson, 1991).

A distribuição destas duas famílias de inibidores de serinoproteinases nas sementes de leguminosas tem sido relacionada com a evolução dessas plantas. Os inibidores do tipo Kunitz são mais comuns nas sementes das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae altamente primitivos, comparativamente à Papilionoideae, o qual frequentemente mostra a presença de inibidores Bowman-Birk (Macedo *et al.*, 2000).

1.3.2. Relevância dos inibidores da família Kunitz

Os inibidores de proteases são encontrados em microorganismos, plantas e animais (Joanitti *et al.*, 2006). Esses inibidores, de maneira geral, podem ser considerados como modelos para a inibição de enzimas proteolíticas, especialmente aquelas que são comumente responsáveis pela digestão de animais e de microorganismos (Richardson, 1977).

Os inibidores de proteases, uma vez incorporados à dieta experimental em animais, suprimem o câncer de pele, pulmão, cólon e fígado (Troll *et al.*, 1987). A ação quimiopreventiva de tais inibidores pode ser precedida de alguns eventos específicos: bloqueio da formação de tumores, da expressão de oncogenes e da progressão de processos metastáticos. *In vitro*, são capazes de suprimir processos neoplásicos, por meio de mecanismos de supressão da formação de radicais de oxigênio (Goldstein *et al.*, 1979).

Os inibidores participam de reações de controle endógeno de proteinases envolvidas em diferentes processos fisiológicos, atuando como agentes reguladores e, para alguns representantes, como agentes protetores contra a ação de insetos e

microorganismos (Ryan, 1991; Franco *et al.*, 2003). No entanto, as funções fisiológicas dos inibidores de proteases de leguminosas ainda não foram completamente esclarecidas.

Os inibidores também têm sido considerados proteínas de reserva em sementes de leguminosas, durante o período de latência até a germinação. Além disso, é reconhecido que os inibidores de proteases (especificamente as que inibem as proteinases) isolados de plantas atuam como agentes supressores de carcinogênese em diversos órgãos e tecidos em animais *in vivo* e *in vitro*, e não apresentam efeitos adversos ao crescimento do animal (Kennedy, 1998).

A família Kunitz é constituída de proteínas com potencial inibitório para suprimir, além de proteinases serínicas, também as proteinases do tipo aspártico e cisteínico (Krizaj *et al.*, 1993). Considerando essas características, os inibidores da família Kunitz podem ser um protótipo apropriado para o desenho de novos inibidores multifuncionais pela engenharia de proteínas.

Kobayashi *et al.* (2004), estudando dois inibidores de tripsina de soja (SBTI): um da família Kunitz (KTI) e outro da Bowman-Birk (BBI), mostrou que o KTI, e não o BBI, inibiu a capacidade invasiva das células de câncer de ovário humano HRA por meio da supressão da cascata de sinalização do ativador plasminogênico do tipo uroquinase (uPA). Comparando o inibidor KTI com o inibidor de protease do tipo Kunitz (bikunin) (Kobayashi *et al.*, 2003), nota-se a diferença de mecanismo de inibição desses inibidores no processo de invasão celular. O bikunin inibe a invasão de células de câncer de ovário bloqueando a cascata de sinalização do fator- β 1 de crescimento dependente de cálcio, enquanto que o KTI inibe a cascata de sinalização do uPA.

Considerando o interesse pelo inibidor da família Kunitz de soja mencionado acima (KTI), uma vez que é relevante para a saúde humana, novo estudo do mecanismo inibitório de membros dessa família foi reportado em 2005. O trabalho de Inagaki *et al.* (2005), mostra um novo mecanismo pelo qual o KTI inibe a via de sinalização das células de câncer de ovário que leva à invasão celular.

Kondraganti *et al.* (2006) mostrou o papel do inibidor-2 Kunitz da via do fator tecidual (TFPI-2) associado à matriz extracelular, na invasão de meningiomas malignos. A super-expressão do PFTI-2 inibe a formação do tumor intracranial em ratos. Os dados dos autores corroboram observações precedentes dos mesmos,

onde o PFTI-2 tem um importante papel na inibição da progressão de tumor e potencial na terapia anti-câncer.

O fator de crescimento de hepatócito (HGF) apresenta uma plethora de funções nas metástases de câncer e crescimento de tumor, o estudo desse fator de crescimento correlacionado com inibidores é de suma importância na redução e tratamento de câncer. Parr e Jiang (2006), analisando os novos inibidores Kunitz (HAI-1) e 2 (HAI-2) que regulam a atividade do HGF por meio da inibição do HGFA, matriptase e hepsina, mostraram que os recombinantes dos HAI suprimiram a invasão do câncer de mama mediado por fibroblasto. De maneira geral, os dados desse trabalho demonstraram o importante papel de ambos os inibidores na metástase e seu potencial terapêutico.

Shakiba *et al.* (2007) mostrou que o inibidor de tripsina Kunitz de soja (STI) atua de forma específica em processo de angiogênese. Conforme os autores, a combinação destas proteínas com agentes citotóxicos pode ocorrer no processo patológico, tais como metástase tumoral.

Além do papel anti-carcinogênico, os inibidores Kunitz têm outras importantes funções, tais como efeitos adversos sobre o desenvolvimento de insetos, podendo servir como um fator de resistência transgênico (Shukle e Wa, 2003). Nesse sentido, o interesse em encontrar inibidor que possa funcionar como bioinseticida em determinada fase da vida de pragas de lavouras tem sido reportado na literatura. Macedo *et al.* (2003) purificou um novo inibidor de tripsina da família Kunitz das sementes de *Peltophorum dubium*, consistindo de uma única cadeia polipeptídica e massa molecular de 20 kDa. Tal inibidor foi administrado como alimento para o *Anagasta kuehniella* (lepidóptera) - inseto que ataca grãos armazenados e produtos de arroz, aveia, centeio, milho e trigo - em uma dieta artificial. A concentração do inibidor necessária na dieta para provocar uma redução de 50% no peso da quarta larva ínstar foi de aproximadamente 1%. A ação do inibidor de tripsina de *Peltophorum dubium* (PDTI) sobre a lepidóptera pode envolver a inibição da atividade tríptica no intestino médio da larva e a associação com a coluna de quitina e estruturas quitinosas na membrana peritrófica e/ou intestino do inseto.

O inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) afeta o crescimento e a atividade de enzimas digestivas durante o desenvolvimento de *Spodoptera litura*,

uma das maiores pragas na agricultura, cuja larva pode desfoliar cultivos economicamente importantes (Bhattacharyya *et al.* 2007; CAB International, 2002). Os instares larvais jovens (primeiro a terceiro) de *S. litura* são susceptíveis à ação inibitória da tripsina pelo AeTI.

Um inibidor de tripsina e de papaína (cisteino-proteinase) de *Pithecelobium dumosum* (PdKI-2) (Oliveira *et al.*, 2007) apresentou atividade contra proteinases do trato digestivo de *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*, *Ceratitis capitata* (díptera), *Plodia interpunctella* e *Alabama argillacea* (lepidóptera). Esses resultados indicam que PdKI-2, membro da família Kunitz, é um potente agente anti-nutricional de insetos.

Major e Constabel (2008) investigaram a variabilidade bioquímica e funcional dos genes dos inibidores de tripsina Kunitz (KTI) de *Populus trichocarpa* versus *Populus deltoides*. As proteínas recombinantes de KTI mostraram claras diferenças na eficácia contra proteases do tipo tripsina, quimotripsina e elastase, sugerindo uma especialização funcional de diferentes membros desta família de genes. As proteases dos extratos do intestino médio de *Malacosoma disstria*, uma lepidóptera praga de *Populus*, foram fortemente inibidas por pelo menos dois produtos dos genes KTI. Os resultados sugerem que a diversidade na família KTI de *Populus* sp é importante para a especialização bioquímica e funcional, a qual pode ser importante na manutenção da resistência à praga em plantas de vida longa, tais como *Populus*.

Além da ação contra insetos, os membros da família Kunitz podem também inibir enzimas de outros organismos, como é o caso do inibidor Kunitz que inibi a atividade da tripsina, quimotripsina e elastase de *Ancylostoma ceylanicum* (AceKI) (Chu *et al.*, 2004).

Considerando a relevância dos inibidores da família Kunitz, muitos estudos foram desenvolvidos no âmbito do seu isolamento, caracterização físico-química, estrutural e termodinâmica, fornecendo a base para obtenção de inibidores sintéticos mais potentes e versáteis para aplicações na área médica e agropecuária. Informações estruturais são imprescindíveis para o conhecimento do mecanismo de inibição dessas proteínas. Nesse sentido, propomos o estudo estrutural do inibidor de quimotripsina, SPCI, e de seu complexo, com as seguintes estratégias: monitoramento das modificações conformacionais decorrentes da interação inibidor-

enzima, por medidas do tempo de vida de fluorescência do triptofano, em escalas da ordem de nanossegundos a picossegundos e resolução da estrutura tridimensional por cristalografia e difração de raios-X. Essas duas técnicas permitem a análise estática e dinâmica da interação entre as duas moléculas, respectivamente, sendo que a última fornece detalhes da formação do complexo no nível atômico.

1.3.3. Estrutura e mecanismo de inibição dos membros da família Kunitz

Murzin *et al.* (1992), fazendo uma análise cristalográfica dos inibidores Kunitz de soja, de *Erythrina caffra*, de trigo, de interleucinas 1 α e 1 β , fatores de crescimento de fibroblasto (ácido e básico), mostrou que todos apresentam um dobramento incomum, denominada de β -trefoil. Essa estrutura é formada por seis motivos do tipo “grampo”, cada qual organizados por duas fitas- β . Três destas formam uma estrutura em barril e as demais estão dispostas em forma triangular ao redor do barril. Em cada uma das estruturas que forma o triângulo passa um eixo paralelamente ao eixo do barril, o que caracteriza o dobramento β -trefoil. Essas proteínas são diferentes na função, mas apresentam parte da estrutura similar e pouca similaridade de seqüência. Os inibidores Kunitz de tripsina de *Delonix regia* (DrTI) (Krauchenco *et al.*, 2003), STI (Song e Suh, 1998), ETI (Osneti *et al.*, 1990) e o inibidor de *Copaifera langsdorffii* (CTI) (Krauchenco *et al.*, 2001) também apresentam esse dobramento β -trefoil.

Os inibidores de serinoproteinases inibem suas enzimas cognatas ligando fortemente ao sítio ativo da enzima de uma maneira semelhante ao substrato (Laskowski e Kato, 1980), sofrendo uma clivagem extremamente lenta (Bode e Huber, 1992), comparado ao substrato. O modelo consensual da reação serinoproteinase-substrato/inibidor consiste das etapas mostradas na figura 1.

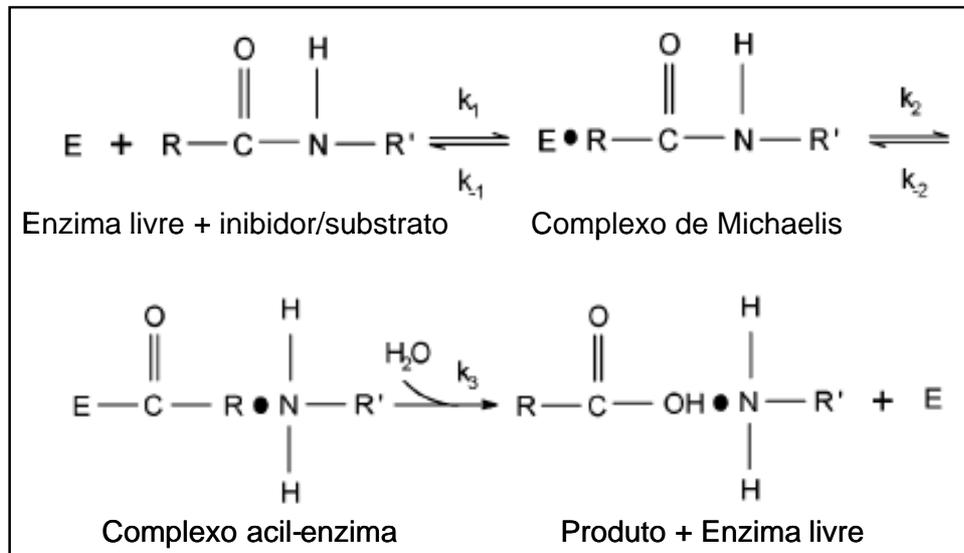


Figura 1. Esquema das etapas da reação entre inibidor-enzima (modificado de Dasgupta *et al.*, 2006).

A enzima está representada por E e os fragmentos N e C-terminal, produzidos após a clivagem da ligação peptídica, estão indicados por R e R', respectivamente.

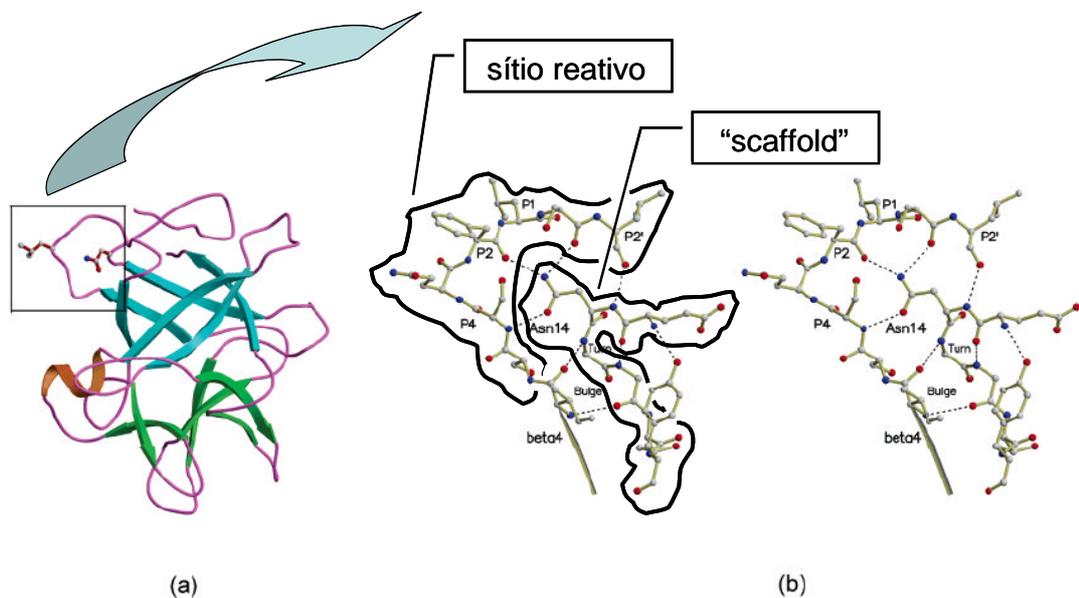


Figura 2. **(a)** Estrutura tridimensional do inibidor de quimotripsina de feijão (WCI), uma proteína com motivo β -trofoil pertencente à família Kunitz e **(b)** representação estereoscópica das interações de ligação de hidrogênio feita pelo resíduo Asn14 do "scaffold" com os resíduos da alça do sítio reativo em WCI. (modificado de Dasgupta *et al.*, 2006).

Estudos estruturais dos inibidores Kunitz mostram a importância de um resíduo de Asn conservado e presente num arranjo estrutural (“scaffold”) (figura 2) responsável pela estabilização conformacional da alça do sítio reativo, por uma rede de ligações de hidrogênio. A estabilização conformacional dessa alça é necessária para o reconhecimento apropriado do sítio ativo da enzima (Onesti *et al.*, 1991; Meester *et al.*, 1998; Dattagupta *et al.*, 1999).

A alça do sítio reativo dos inibidores de serinoproteinases está voltada para fora dessas moléculas (forma protraída) (figura 2), apresentando uma conformação canônica característica (Bode e Huber, 1992; Radisky e Koshland, 2002). No entanto, conforme Dasgupta *et al.* (2006), esta conformação, embora posicione a cadeia lateral de P₁ do seu sítio reativo totalmente acessível ao solvente, também situa os átomos de oxigênio da carbonila dos resíduos P₁' e P₂ para o lado côncavo da alça.

Dessa maneira, após a formação da acil-enzima, o processo de reconstrução da ligação peptídica clivável será facilitado pela ligação de hidrogênio que o nitrogênio da cadeia lateral da Asn mantém com os átomos de oxigênio da carbonila de P₁' e P₂ (Dasgupta *et al.*, 2006).

O referido autor mostrou que a manutenção da conformação da alça do sítio reativo dos inibidores é imprescindível para o reconhecimento enzima-inibidor, no entanto, enfatiza que as ligações de hidrogênio estabelecidas pela Asn é o responsável pela capacidade inibitória dos membros da família Kunitz. Esta característica estrutural foi confirmada pela mutação sítio dirigida da Asn por Ala, na mesma posição. A conformação da alça do sítio reativo foi mantida por duas moléculas de água na parte côncava dessa alça, porém o inibidor apresentou redução na capacidade inibitória (Dasgupta *et al.* 2006).

1.4. Inibidor de quimotripsina de *Schizolobium parahyba* – SPCI

A leguminosa *Schizolobium parahyba* é vulgarmente denominada de guapuruvú ou fideira. Essa espécie apresenta desenvolvimento rápido, atingindo 10 a 20 metros de altura. O guapuruvú é extensivamente distribuído no Brasil, sendo encontrado da Bahia ao Rio Grande do Sul, principalmente em matas pluviais e atlânticas e também no cerrado. A sua copa é densa, as folhas são bipenadas com

numerosos folíolos, semente lisa e dura, floresce entre os meses de setembro a novembro e os frutos drupáceos, contidos em suas valvas, surgem nos meses de julho e agosto (Rizzini, 1971).

O SPCI foi purificado e caracterizado parcialmente seguindo os métodos descritos por Souza *et al.* (1995), a partir das sementes dessa leguminosa. Estes métodos consistiam em várias etapas, consumindo muito tempo para a obtenção do inibidor na sua forma pura. Teles *et al.* (2004) desenvolveram um método simples e eficiente de purificação dessa molécula. Esse método consiste na precipitação das proteínas a partir do extrato bruto com 1,0% de ácido tricloroacético (TCA), seguido pela cromatografia de troca catiônica em uma coluna Sephadex C₂₅₋₁₂₀. O sobrenadante obtido da precipitação por TCA contém um alto conteúdo de SPCI com pequenas quantidades de contaminantes de baixa massa molecular.

Os inibidores protéicos podem apresentar especificidade para diversas enzimas com diferentes graus de extensão. A diversidade da inibição de diferentes serinoproteinases foi evidenciada por Sampaio *et al.* (1991) para inibidores isolados de diferentes leguminosas, como o inibidor de *Enterolobium contortisiliquum*, com atividade anti-tripsina, fator XIIa e kalicreína plasmática humana, e o inibidor de *Torresea cearensis*, que inativa tripsina e fator XIIa, mas sem atividade contra kalicreína plasmática, tissular e trombina. Em contraste, Souza (1992) mostrou que SPCI não apresenta atividade inibitória sobre outras proteinases testadas.

O SPCI é uma proteína com massa molecular de 20 kDa, de cadeia única e duas ligações dissulfeto (Souza *et al.*, 1995). A sua estrutura secundária consiste principalmente de folhas β -antiparalelas (Teles *et al.*, 1999) mantidas por forças de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Souza *et al.*, 2000). Por apresentar um alto conteúdo de resíduos de glicina, aspartato, glutamato e alanina (Souza *et al.*, 1995), assemelha-se aos inibidores do tipo Kunitz das diferentes espécies de *Eritrina* (Joubert e Sharon, 1985). O SPCI forma com a α -quimotripsina um complexo binário (Mm = 45 kDa) na proporção molar de 1:1, cuja constante de inibição (Ki) é $5,85 \times 10^{-8}$ M (Souza *et al.*, 1995).

A termoestabilidade dos inibidores de serinoproteinases de baixa massa molecular está geralmente associada com o alto conteúdo de ligações dissulfeto. O SPCI é uma molécula termoestável, mas essa estabilidade parece não estar associada a essas ligações, como também foi verificado para o inibidor de

quimotripsina isolado de feijão alado (“winged bean”) (Kort, 1981). O SPCI permanece estável mesmo a temperatura acima de 75°C em pH 7, perdendo gradualmente sua atividade inibitória quando atinge 95°C por 1 hora. Após 5 horas a 95°C ocorre sua inativação total. Portanto, o SPCI é uma proteína termoestável embora contenha somente duas ligações dissulfeto (Teles *et al.*, 1999).

A redução das duas ligações dissulfeto provoca mudanças conformacionais no SPCI sem alterar a sua atividade inibitória, sugerindo que as ligações dissulfeto não estão diretamente relacionadas com a manutenção da conformação do sítio reativo do inibidor. Esses resultados sugerem que a inativação do SPCI envolve mudanças conformacionais e que as interações hidrofóbicas e eletrostáticas têm um papel significativo, enquanto as ligações dissulfeto são de importância secundária na manutenção da estabilidade térmica da molécula (Souza *et al.*, 2000).

O SPCI é uma proteína altamente termoestável em pH 7 ($\Delta G^{25} = 15,4 \pm 2,1$ kcal.mol⁻¹; $\Delta H_m = 145 \pm 6$ kcal.mol⁻¹; $T_m = 84,9^\circ\text{C}$) e maior estabilidade em pH 4,2 ($\Delta G^{25} = 20$ kcal.mol⁻¹; $T_m = 85^\circ\text{C}$; $\Delta H = 165$ kcal.mol⁻¹) devido a proximidade do ponto isoelétrico (Teles *et al.*, 2005).

A análise das curvas dicróicas em várias temperaturas em pH 7 revela que a conformação nativa do SPCI é termicamente estável a temperatura abaixo de 70°C com um desdobramento parcial, menor que 6%, de seu conteúdo secundário. A estrutura secundária do inibidor é apenas perturbada sobre aquecimento de 70 a 90°C. Estes resultados indicam uma compensação entre um aumento de aproximadamente 10% de α -hélice, diminuição de 36% em voltas- β e uma desorganização total do conteúdo de folhas- β (Teles *et al.*, 2005).

A temperatura de estabilidade máxima de SPCI é de aproximadamente 10°C. Pequenas diferenças no valor de pH resultaram em leves mudanças em T_m e no valor correspondente de ΔG^{25} de estabilidade, mas nenhuma mudança significativa no T_{max} (Teles *et al.*, 2005).

A tendência de auto-associação dos inibidores de serinoproteinases tem sido reportada na literatura (Ventura *et al.*, 1984). Essa tendência à formação de estruturas oligoméricas está associada à organização estrutural protéica incomum, que é a exposição de resíduos hidrofóbicos (Freitas *et al.*, 1997). O inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (BTCl), também objeto de estudo do Laboratório de Biofísica Molecular, apresenta um grupo de resíduos (“cluster”) de

cadeias laterais carregadas localizado na região intersubdomínio do BTCI (Asp³⁶, Arg³⁸ e His⁴³) (Freitas *et al.*, 2007). A Asp⁶³, que também faz parte desse “cluster” contribui para a auto-associação através das ligações de hidrogênio mediado por moléculas de água. Esse “cluster” foi anteriormente encontrado em 1BBI (Werner e Wemmer, 1992) e 1MVZ (Catalano *et al.*, 2003). A tendência à formação de oligômeros do SPCI foi investigada por Microscopia de Força Atômica (Leite *et al.*, 2002). O SPCI apresenta formas oligoméricas piramidal, cometa, “Z”, elipsóide e hexagonal. Destas, a que apresentou maior frequência é a forma hexagonal. A forma monomérica desse inibidor apresenta um raio de Stokes (r) e coeficiente de difusão a 20°C em água ($D_{20^\circ w}$) de 1,98 nm e $10,7 \times 10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente. Para o complexo com a quimotripsina esses valores são $r = 2,71 \text{ nm}$ e $D_{20^\circ w} = 7,9 \times 10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Souza, 1992).

A cristalização do SPCI está concluída e o refinamento da estrutura tridimensional está em andamento, dependendo da seqüência primária desse inibidor que ainda não foi obtida. O SPCI foi cristalizado usando uma solução contendo 0,1 M de tampão acetato de sódio tri-hidratado pH 4,6, 33% (v/v) PEG 2000 e 0,2 M de sulfato de amônio. Os dados foram coletados a 1,8 Å de resolução a partir de cristal único de SPCI sob condições criogênicas (Teles *et al.*, 2007).

Neste trabalho pretende-se investigar as características estruturais durante e após a formação do complexo SPCI-quimotripsina utilizando métodos espectroscópicos de fluorescência dinâmica, espalhamento de luz dinâmico e cristalização de proteínas.

2. JUSTIFICATIVA

A purificação, caracterização físico-química e estrutural de inibidores de serinoproteínas tem sido uma das principais linhas de pesquisa do Laboratório de Biofísica Molecular da UnB, desde os anos 70, sob a supervisão do Prof. Dr. Manuel M. Ventura. Atualmente essa linha de pesquisa é coordenada pela Prof^a Dr^a Sonia Maria de Freitas. Os inibidores mais estudados têm sido aqueles isolados de sementes de *Vigna unguiculata* (Inibidor de Tripsina e Quimotripsina - BTCl) e de *Schizolobium parahyba* (SPCl). As pesquisas desenvolvidas até os dias atuais sobre o SPCl resultaram em informações relevantes sobre esse inibidor da família Kunitz.

As pesquisas sobre os inibidores de proteínas estão sendo direcionadas para suas aplicações em medicina, agricultura e biotecnologia. Portanto avaliar as modificações conformacionais decorrentes das interações inibidor-enzima é fundamental para o desenvolvimento de inibidores sintéticos visando o desenho de drogas, além de melhor entender o mecanismo de inibição.

O acompanhamento das modificações conformacionais resultantes da associação molecular pela atenuação do tempo de vida de fluorescência tem sido um dos métodos mais sensível e utilizados nesse tipo de estudo. Esse método permite registrar modificações conformacionais dos triptofanos e nos microambientes que os envolvem em escalas de tempo da ordem de nanosegundos a picosegundos. Para as análises da interação inibidor-enzima, esse método foi utilizado, sendo os modelos de estudo o SPCl e a quimotripsina. O SPCl é um inibidor pertencente à família Kunitz, cujos membros têm sido freqüentemente associados à prevenção e tratamento de vários tipos de câncer e a ação contra atividade de enzimas encontradas em vários tipos de insetos e nematóides, como descrito no sub-tópico “Relevância dos inibidores da família Kunitz”.

Os trabalhos que associam inibidores Kunitz com a ação anticarcinogênica e bioinseticida comumente inibem a atividade catalítica da tripsina. Os trabalhos que relatam os inibidores Kunitz que suprimem a atividade da quimotripsina são raramente descritos na literatura e poucas estruturas tridimensionais resolvidas estão depositadas no PDB (4WBC - Dattagupta *et al.*, 1999; 1MTN – Bolognesi *et al.*, 1997).

O trabalho aqui proposto é de alta relevância por envolver o estudo de um inibidor da família Kunitz, cujos membros têm sido reportados como importantes ferramentas em potencial nas áreas da saúde e de controle biológico de pragas na agricultura pela ação anticarcinogênica e bioinseticida desses inibidores, respectivamente. Além disso, considerando o baixo número de trabalhos relacionados à estrutura tridimensional desses inibidores em complexo binário com a quimotripsina, o estudo aqui proposto poderá contribuir, juntamente com a resolução da estrutura tridimensional do complexo por difração de raios-X, para o entendimento do mecanismo de inibição de inibidores Kunitz contra a quimotripsina, e das modificações conformacionais que ocorrem durante a formação desse complexo, por medidas do tempo de vida de fluorescência.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar as modificações conformacionais da associação entre o SPCI e a α -quimotripsina, a estabilidade do inibidor e cristalizar o complexo binário formado por essas duas moléculas.

3.2. Objetivos específicos

- ⇒ Obter o extrato bruto protéico das sementes de *S. parahyba* e purificar o SPCI e complexo binário;
- ⇒ Monitorar as mudanças conformacionais resultantes da associação SPCI-quimotripsina por métodos espectroscópicos de fluorescência estacionária e dinâmica;
- ⇒ Analisar a tendência de associação do SPCI em oligômeros por método espectroscópico de espalhamento de luz dinâmico - DLS (“Dynamic Light Scattering”);
- ⇒ Determinar a estabilidade térmica do inibidor sob condições redutoras de suas ligações dissulfeto por dicroísmo circular;
- ⇒ Cristalizar e coletar os dados cristalográficos do complexo binário.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das sementes e do extrato bruto

As sementes de *Schizolobium parahyba* foram coletadas no Campus da Universidade de Brasília (UnB). O tegumento dessas sementes, bastante resistente, foi removido manualmente com uma morsa mecânica, e o endosperma foi triturado em moinho elétrico até se obter o pó.

Duzentos gramas das sementes moídas foram suspensas em 1 L de NaCl a 0,15 M e mantidas sob agitação por 24 horas a 6°C. Posteriormente, essa mistura foi homogeneizada em um liquidificador e filtrada em pano de malha fina. A suspensão resultante (sps-1) dessa filtragem foi centrifugada a 8000 rpm (raio = 14 cm) durante 40 minutos e o bagaço foi descartado (figura 3).

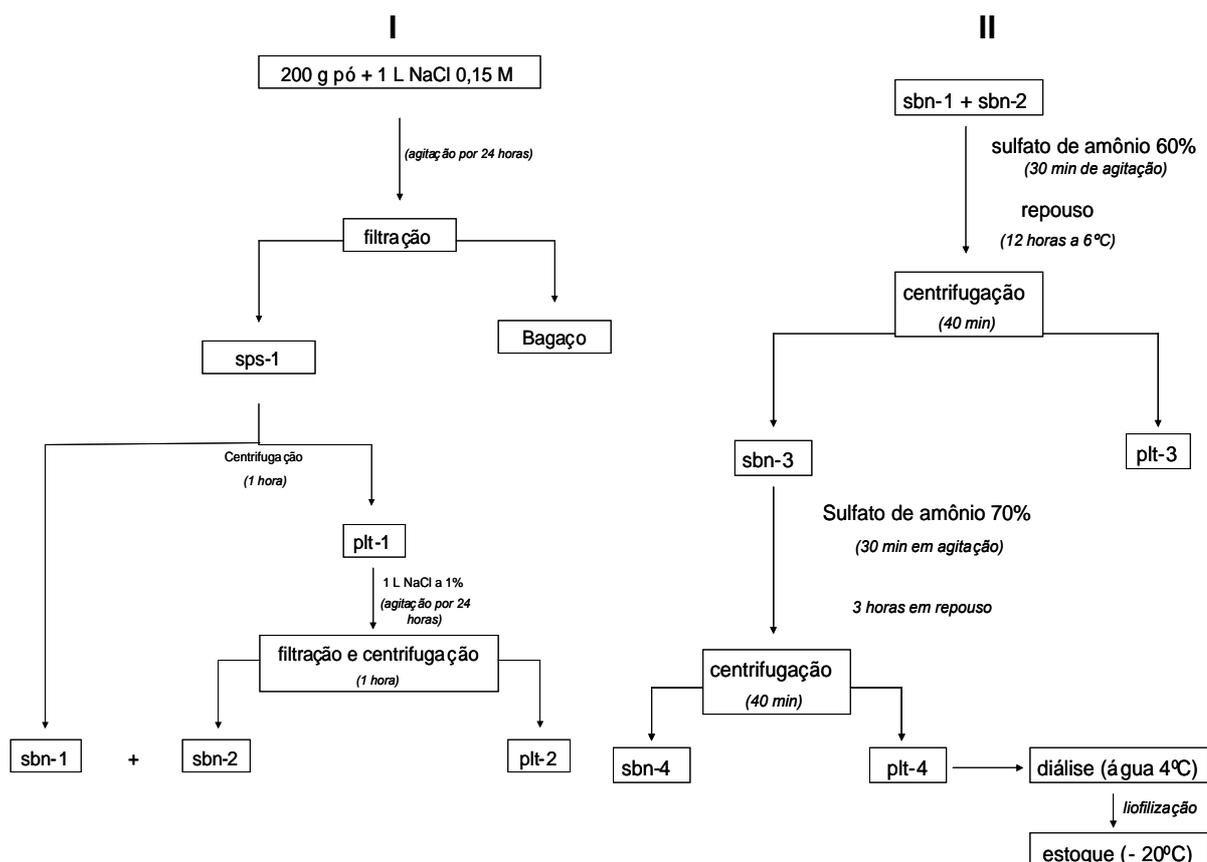


Figura 3. Diagrama da produção de extrato bruto. Protocolo desenvolvido por Souza *et al.* (1995).

O sobrenadante (sbn-1) e o precipitado (plt-1) oriundos do sps-1 foram tratados da seguinte maneira: o plt-1 foi dissolvido em 1L de NaCl 1%, repetindo o

procedimento já mencionado acima. O plt-2 advindo desta etapa foi descartado, enquanto o sbn-2 foi reunido com o sbn-1 ($sbn3 = sbn1 + sbn2$).

Ao sbn-3 foram adicionados cristais de sulfato de amônio até atingir 60% de saturação, mantendo em agitação por 30 minutos a 6°C. Após 12 horas em repouso (4°C), a mistura foi centrifugada a 8000 rpm (raio = 14 cm) por 40 minutos. O plt-3 foi descartado e ao sbn-3 foi adicionado sulfato de amônio até a saturação de 70%, mantido em agitação por 30 minutos e, após 3 h em repouso a 4°C, foi centrifugado a 8000 rpm (raio = 14 cm) durante 40 minutos. O precipitado obtido da centrifugação (plt-4) foi dissolvido em água no menor volume possível para atingir a solubilização. Essa amostra foi submetida à diálise contra água destilada (4°C), liofilizada e estocada a -20°C (extrato bruto). O correspondente sbn-4 foi descartado (Souza *et al.*, 1995).

4.2. Purificação do SPCI e do complexo binário

O protocolo para a purificação do SPCI utilizado neste trabalho foi o desenvolvido por Teles *et al.* (2004), com algumas modificações. Conforme referência, o ácido tricloroacético (TCA) é utilizado para a obtenção do SPCI semi-purificado. Neste trabalho, foi padronizada a porcentagem do TCA onde a presença de contaminantes estivesse reduzida. As seguintes porcentagens de TCA foram testadas: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 e 1,6%.

Cem mg do extrato bruto foram dissolvidos em 50 mL do tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,1. A solução foi centrifugada a 8000 rpm (raio = 14 cm) durante 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido à precipitação com TCA, mantido em agitação por 15 minutos sob temperatura de 4°C. Após agitação, a solução permaneceu em repouso por 30 minutos em gelo. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi dialisado contra água a 4°C e liofilizado.

A amostra semi-purificada (liofilizada) foi dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,1 e aplicada em uma coluna de troca catiônica SP-Sephadex C₂₅₋₁₂₀, equilibrada com o mesmo tampão. O inibidor foi eluído em um gradiente de zero a 1,0 M de NaCl. O fluxo de 180 mL.h⁻¹ foi mantido constante por uma bomba peristáltica LKB, sendo coletadas frações de 1,0 mL por tubo.

As frações coletadas foram lidas em um espectrofotômetro Jasco V-530 em 280 nm. Todas as etapas da purificação (itens 1 e 2) foram monitoradas por eletroforese em gel de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

A obtenção e purificação do complexo binário seguiu o protocolo desenvolvido por Souza *et al.* (1995): 17,5 mg de quimotripsina e 15,5 mg de SPCI foram dissolvidos em 2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM KCl 0,2 M pH 7,5. Essa mistura foi deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente antes da aplicação na coluna Sephadex G₇₅ (3 x 100 cm) (equilibrada com o mesmo tampão). As frações coletadas foram de 25 mL.tubo⁻¹, mantendo um fluxo de 2,5 mL.h⁻¹.

O volume vazio (V_0) foi determinado utilizando Blue Dextran (massa molecular: 2 x 10⁶ Da). Dois mg de Blue-dextran foram dissolvidas em 1 mL de tampão Tris-HCL 50 mM KCl 0,2 M pH 7,5, à qual foi acrescentada sacarose antes da aplicação para aumentar a viscosidade do meio e facilitar a entrada da amostra no gel.

4.3. Variações conformacionais do SPCI em associação com α -quimotripsina

A interação entre SPCI e a α -quimotripsina foi monitorada por meio de medidas da intensidade da fluorescência estacionária no Laboratório de Biofísica Molecular da UnB e do tempo de vida da fluorescência por meio do método no domínio da frequência, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS (Campinas, SP), utilizando a fonte de radiação de luz síncrotron.

4.3.1. Espectroscopia de fluorescência estacionária

O experimento foi realizado em um fluorímetro JASCO FP-6500 equipado com sistema de controle de temperatura do tipo Peltier JASCO ETC-273T com circulação de água. O monitoramento dos espectros de emissão de fluorescência foi realizado em um intervalo de 300 a 400 nm (intervalo: 0,5 nm), utilizando um comprimento de onda de excitação de 295 nm. Nesse comprimento de onda de excitação a interferência de emissão dos resíduos tirosina pode ser considerada negligenciável. A abertura de ambos os “slits” (excitação e emissão) foi de 5 nm. Os dados foram coletados à velocidade de 200 nm.min⁻¹.

O SPCI e a α -quimotripsina puros foram dissolvidos separadamente em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 50 mM pH 7,6, centrifugados a 12000 rpm durante 20 minutos. As absorvâncias das amostras foram lidas em um espectrofotômetro em comprimento de onda fixa de 280 nm, tendo como branco o mesmo tampão. Os valores das respectivas absorvâncias foram usados para a determinação da concentração das amostras. As concentrações das amostras foram calculadas considerando-se os valores de $A^{1\%}_{280\text{nm}}$ de 6,18 e 20,4 para o SPCI e a α -quimotripsina, respectivamente.

A enzima, na concentração de 1,1 μ M (250 μ L), foi titulada gradativamente (2 em 2 μ L, sendo que as três primeiras adições foram de 1 em 1 μ L) pelo SPCI na concentração de 11 μ M. A estequiometria de 1:1 para ambas as proteínas foi atingida no volume final de 275 μ L. A linha de base foi feita com tampão Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 50 mM pH 7,6, o mesmo utilizado na diluição do inibidor.

As medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. As medidas da intensidade de fluorescência foram feitas nas seguintes temperaturas: 25, 28, 30, 35 e 38°C. A variação da temperatura foi utilizada para diferenciar a atenuação estática da dinâmica (ver “Fundamentação Teórica” em Anexo 1). Em cada uma delas, aguardou 5 minutos após a estabilização da temperatura.

Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o OriginPro 8.0. Três medidas consecutivas foram acumuladas e a média foi considerada para os registros dos espectros.

4.3.2. Espectroscopia de fluorescência dinâmica

Os mesmos procedimentos utilizados para a diluição e determinação da concentração do SPCI e da enzima foram repetidos neste experimento. Dois ensaios de interação foram realizados: no primeiro as ligações dissulfeto do SPCI foram conservadas e no segundo essas ligações foram reduzidas.

No primeiro ensaio, 700 μ L de cada solução foram acondicionados em uma cubeta (caminho ótico: 1 cm) de quartzo para a leitura do tempo de vida da fluorescência em um espectrofluorímetro K-2, acoplado à fonte de radiação síncrotron, no LNLS (Campinhas, SP). Após a leitura dos espectros de ambas as

amostras, a solução de SPCI na concentração fixa de 50 μM foi titulada com volumes crescentes, correspondendo às concentrações de 1,85 a 50 μM da α -quimotripsina.

A α -quimotripsina (25 μL) foi adicionada durante a titulação, sendo que as três primeiras adições foram de 1 μL , e as demais de 2 em 2 μL até atingir o volume total de 725 μL na cubeta. Neste volume a proporção estequiométrica foi de 1:1.

As medidas do tempo de vida foram realizadas com um número de frequência de 20 MHz a partir de 8 a 200 MHz. Todas as medidas do tempo de vida foram realizadas na configuração “magic-angle”, isto é, o decaimento da intensidade de fluorescência é frequentemente medido por meio de um polarizador orientado a 54,7° a partir do eixo vertical (eixo-z). Esta condição é usada para evitar os efeitos da difusão rotacional e/ou anisotropia no decaimento da intensidade (Lakowicz, 2004). A temperatura foi mantida a 25°C por um termostato externo ao espectrofluorímetro.

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

Os dados de desmodulação (razão de modulação) e deslocamento de fase foram analisados pelo software VINCI (ISS Inc.) e os gráficos foram feitos utilizando o programa OriginPro 8.0. Todos os dados foram analisados com diferentes modelos incluindo um, dois e três tempos de vida. O ajuste dos dados foi baseado no valor mínimo do χ^2 , o qual foi calculado usando os desvios padrões de $\pm 0,2^\circ$ e $\pm 0,004$ para o ângulo de fase e a desmodulação, respectivamente.

Considerando que a concentração é um fator que não interfere no estudo de fluorescência dinâmica, o mesmo experimento foi realizado a 100 μM na presença de NaCl 0,2 M, visando observar a influência do sal nas interações.

Para o segundo ensaio foi utilizado o SPCI com as ligações dissulfeto reduzidas com DDT 2 mM. Nesse ensaio a solução de SPCI na concentração de 100 μM e na presença de NaCl 0,2 M foi titulada com adição da enzima. O NaCl foi adicionado

nessa solução para evitar possíveis agregações devido à redução das ligações dissulfeto por exposição de alguns resíduos hidrofóbicos.

As equações utilizadas para análise dos resultados desses experimentos estão disponíveis no Anexo 1 (Fundamentação Teórica).

4.4. Estabilidade conformacional - desnaturação térmica

A desnaturação térmica do SPCI (com e sem as ligações dissulfetos) e na presença de NaCl 0,2 M foi acompanhada por espectroscopia de dicroísmo circular utilizando um espectropolarímetro JASCO-810 do LNLS, cuja temperatura foi controlada internamente por um sistema Peltier. Os dados foram registrados utilizando a varredura de 50 nm/min em intervalos de 0,5 nm. Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o OriginPro 8,0.

A leitura, registrada pelos espectros, foi realizada em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. A melhor concentração da amostra foi aquela na qual o HT[V] foi menor que 700 para evitar os danos dos espelhos e da fonte de luz do equipamento. A produção de ozônio no comprimento de onda afastado do UV foi evitada pelo fluxo de nitrogênio gasoso.

Antes de realizar o experimento propriamente dito, espectros foram feitos para determinar o comprimento de onda a ser fixado para o registro das curvas de desnaturação térmica. Cinco varreduras foram acumuladas e a média dos espectros foi armazenada. Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados elevando a temperatura de 20 a 95°C, mantendo sempre um equilíbrio de 5 minutos antes de realizar cada medida. A estrutura secundária foi estimada pelo ajuste das curvas dicróicas no comprimento de onda de 260 a 190 nm, utilizando o software CDNN 2.1.

As elipticidades observadas em miligraus foram convertidas em elipticidade residual molar $[\theta]$, baseando-se no valor da massa molecular de 112 por resíduo, na concentração da amostra e nas dimensões da cubeta. Todos os dados foram corrigidos com a linha de base para retirar a contribuição do tampão.

Os cálculos da fração do inibidor no estado desdobrado (f_U), a constante de equilíbrio (K) para estas transições e os valores dos parâmetros termodinâmicos

que caracterizam a estabilidade estrutural serão realizados de acordo com as seguintes equações, caso seja obtido a desnaturação térmica:

$$f_U = \frac{(y_F - y)}{(y_F - y_U)} \quad (\text{Equação 2})$$

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f_U}{(1 - f_U)} = \frac{(y_F - y)}{(y - y_U)} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln \left[\frac{(y_F - y)}{(y - y_U)} \right] \quad (\text{Equação 4})$$

A temperatura de transição T_m , correspondente ao ponto central da curva de desnaturação térmica, será calculada a partir da curva ΔG versus T , assumindo o valor de T_m quando $\Delta G = 0$.

A entalpia foi calculada a partir da equação de van't Hoff (equação 5).

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad (\text{Equação 5})$$

A estabilidade correspondente a 25°C (ΔG^{25} , ΔH_m e ΔS_m) será estimada a partir da equação de Gibbs (equação 6), considerando o intervalo de temperatura de desnaturação.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 6})$$

O SPCI puro foi pesado em balança analítica e dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl_2 50 mM pH 7,6, centrifugado a 12.000 rpm durante 20 minutos. O tampão foi filtrado (0,22 μm) antes do preparo da solução para retirar possíveis

partículas de poeira dispersas no solvente, já que o princípio do ELD é baseado no tamanho das partículas em solução. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro para o cálculo da concentração da amostra, conforme citado acima (purificação do SPCI).

A tendência do SPCI à oligomerização foi verificada variando a concentração e a temperatura. A solução do SPCI foi preparada nas seguintes concentrações: 25, 50, 75 e 100 μM . As medidas do espalhamento de luz de todas essas soluções foram feitas nas seguintes temperaturas: 4, 10, 25, 30, 40, 50 e 60°C.

Os dados foram obtidos em um equipamento de espalhamento de luz dinâmico (ELD) DynaPro modelo LSR, disponibilizado no LNLS, controlado pelo software “DYNAMICS V6”. A temperatura foi controlada por um termostato externo ao ELD e equilibrada por 10 minutos antes de cada leitura.

Além dos ensaios de temperatura, medidas de ELD variando o pH também foram realizadas: pH 2 (KCl 50 mM), pH 3 (Glicina-HCl 50 mM), pH 4, 5 e 6 (NaAc 50 mM), pH 7, 8 e 9 (Tris-HCl 50 mM), e pH 10, 11 e 12 (Glicina-NaOH 50 mM). Neste caso a temperatura foi conservada a 25°C.

A cubeta foi cuidadosamente limpa com detergente Hermax, água Milli-Q e posteriormente com metanol. Imediatamente após a lavagem com metanol, a cubeta foi submetida à secagem por pressão de ar. A amostra (50 μL) foi colocada com cuidado na cubeta para evitar a formação de bolhas de ar.

A seleção dos melhores pontos foi determinada automaticamente pelo programa Dynamics V6 conforme os seguintes parâmetros: amplitudes mínima (zero) e máxima (1), “baseline” ($\pm 0,01$) e SOS (“squares error statistic”) máximo (500). O modelo molecular estabelecido para os cálculos foi o da proteína na forma globular. O solvente foi o tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e foram registradas 100 aquisições em cada variável experimental.

A análise dos dados foi feita utilizando o mesmo programa, “DYNAMICS V6”, e baseada nos parâmetros “baseline”, SOS e polidispersividade. O parâmetro “baseline” indica se a amostra é mono, di ou multimodal (uma, duas ou várias formas moleculares, respectivamente) e a qualidade do ajuste dos dados.. A distribuição monomodal, isto é, solução com apenas um forma da molécula, é definida pela faixa de “baseline” variando de 0,997 a 1,002; a bimodal (duas formas moleculares) tem um “baseline” na faixa de 1,003 a 1,005. “Baseline” maiores que

1,005 indicam amostras multimodais (muitas formas moleculares), podendo incluir também contaminantes ou ruído do aparelho (Borgstahl, 2007).

O parâmetro “SOS” (“squares error statistic”) indica a qualidade dos dados obtidos. Os valores de SOS na faixa de 1,000 – 5,000 representam provavelmente amostra em estado de equilíbrio e representada pelo baixo ruído do aparelho e erros desprezíveis; de 5,000 – 20,000 indicam erros devido ao ruído, baixa concentração de proteína ou pouca polidispersidade e erros aceitáveis. Valores acima de 20,000 indicam alto erro/ruído devido à alta polidispersidade na distribuição do tamanho da molécula (agregação) e solvente irregular (Borgstahl, 2007).

Os valores da polidispersidade foram usados somente para distribuição monomodal. Polidispersidade menor que 15% indica uma solução monodispersa (alta probabilidade da proteína ser cristalizada); menor que 30%, polidispersidade moderada (proteína pode ser cristalizada); e maior que 30% para quantidades significativamente polidispersa (baixa probabilidade da proteína ser cristalizada). A massa molecular (20 kDa) e o raio de Stokes (2,1 nm) do SPCI são conhecidos (Souza, 1992), o que facilitou a interpretação dos dados.

4.5. Cristalização do complexo binário

Os ensaios de cristalização do complexo binário do SPCI com a α -quimotripsina foram realizados de acordo com o método de difusão a vapor (McPherson, 1990) em placas de cristalização de “gota sentada”, em uma sala com temperatura devidamente controlada (18°C).

As condições iniciais de cristalização foram realizadas em placas de cristalização, utilizando o sistema de robotização do LNL (Matrix Maker e Honeybee), a partir de kits de cristalização comercialmente disponíveis: “Joint Center for Structural Genomics” (JCSG; Page *et al.*, 2003), “PACT Suite” para análise sistemática do efeito do pH, ânions e cátions (Newman *et al.*, 2005), sinergia de precipitante (Majeed *et al.*, 2003), “Wizard Screens I e II” (Hol *et al.*, 2001), “SaltRx” (Gilliland *et al.* 1994; Kanaujia *et al.*, 2007), “Crystal Screen 1 e 2” (Jancarik e Kim, 1991) e Jena I e II (Jancarik *et al.*, 2004). O reservatório das placas utilizado pelo sistema de robotização armazena 80 μ L da solução precipitante. A gota foi

preparada adicionando 0,2 μL da solução do reservatório e 0,2 μL da solução da proteína. A solução da proteína (liofilizada) foi dissolvida em água Milli-Q na concentração de 10 a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

O monitoramento do aparecimento e crescimento dos cristais foi realizado por meio da observação das gotas em lupa, nas placas de cristalizações lacradas, com a menor perturbação possível. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos, foi possível determinar qual a condição mais favorável para a cristalização. As condições que apresentaram cristais foram submetidas a sucessivos melhoramentos (refinamentos) até se conseguir cristais adequados.

Quatorze mg do complexo binário foram dissolvidos em 1 mL de água Milli-Q. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm (raio = 5,5 cm) durante 30 minutos e o sobrenadante foi usado para fazer as placas de cristalização manuais. A gota continha 1 μL da amostra e 1 μL do precipitante, equilibrada em um reservatório com 300 μL da mesma solução precipitante.

Um dos refinamentos realizados foi a montagem das placas de cristalização com a amostra de proteína na presença de aditivos. Os aditivos do kit Hampton Research (quadro I) foram utilizadas para promover a formação de cristais. Neste caso, cada gota continha 0,9 μL da proteína, 0,9 μL do precipitante e 0,2 μL do aditivo, equilibrada com 300 μL da mesma solução precipitante no reservatório. A cada condição, portanto, foram experimentados 72 tipos diferentes de aditivos. As observações dos cristais, nas condições iniciais e de refinamento foram registradas fotograficamente.

4.6. Coleta de dados cristalográficos

A coleta dos dados foi realizada na linha W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os cristais foram inicialmente banhados em uma solução crioprotetora preparada com base nas condições de obtenção de cada cristal e com adição de glicerol ou polietilenoglicol 400 (PEG 400) e, só então, montados em “loops” de nylon.

Quadro I. Kit de aditivos Hampton Research.

Nº	Additive screen-1 (HR2-420)		Additive screen-2 (HR2-430)		Additive screen-3 (HR2-422)	
	Conc.	Aditivos	Conc.	Aditivos	Conc.	Aditivos
1	0,1M	Cloreto de bário dihidratado	1,0M	Iodeto de sódio	1,0M	Sulfato de amônio
2	0,1M	Cloreto de cádmio hidratado	0,1M	L-cisteína	1,0M	Cloreto de céσιο
3	0,1M	Cloreto de cálcio dihidrato	0,1M	Sal EDTA sódio	1,0M	Cloreto de potássio
4	0,1M	Cloreto de cobalto II hexahidratado	0,1M	Nicotinamida adenina dinucleotídeo	1,0M	Cloreto de lítio
5	0,1M	Cloreto de cobre II dihidratado	0,1M	Sal de adenosina-5-trifosfato disódio	2,0M	Cloreto de sódio
6	0,1M	Cloreto de magnésio hexahidratado	30% w/v	D(+)-Glucose	0,5M	Fluoreto de sódio
7	0,1M	Cloreto de manganês II tetrahidratado	30% w/v	D(+)-Sucrose	2,0M	Tricianato de sódio
8	0,1M	Cloreto de estrôncio hexahidratado	30% w/v	Xilitol	30%w/v	Sal de sódio sulfato de Dextran (Mr 5.000)
9	0,1M	Cloreto de ítrio hexahidratada	0,1M	Espermidina	50%v/v	Jeffamina M-600 pH 7,0
10	0,1M	Cloreto de zinco	0,1M	Espermina tetra-HCl	40%v/v	2,5-Hexanodiol
11	30%w/v	Etilenoglicol	30%w/v	Ácido 6-aminohexanóico	40%v/v	(±)-1,3-Butanodiol
12	30%v/v	Glicerol	30%w/v	Dihidrocloro de 1,5-diaminopentano	40%v/v	Polietilenoglicol P 400
13	30%w/v	1,6 Hexanodiol	30%w/v	1,6-diaminohexano	40%v/v	1,4-Butanodiol
14	30%v/v	(+/-)-2-Metil-2-4-Pentanodiol	30%w/v	1,8-diaminooctano	40%v/v	Tert-Butanol
15	50%w/v	Polietilenoglicol 400	1,0M	Glicina	40%v/v	1,3-Propanodiol
16	0,1M	Trimetilamina HCl	0,3M	Glicil-glicil-glicina	40%v/v	Acetonitrila
17	1,0M	Hidrocloro de guanidina	0,1M	Cloreto de cobalto III hexamina	40%v/v	g-Butirolactona
18	0,1M	Uréia	0,1M	Taurina	40%v/v	1-Propanol
19	15%v/v	1,2,3-Heptanotriol	0,1M	Hidrocloro de betaina	5% v/v	Acetato de etila
20	20%w/v	Hidrocloro de benzamida hidratado	5%w/v	Polivinilpirrolidona k15	40%v/v	Acetona
21	30%v/v	1,4-Dioxano	3,0M	NDSB-195	0,25%v/v	Diclorometano
22	30%v/v	Etanol	2,0M	NDSB-201	7%v/v	1-Butanol
23	30%v/v	2-Propanol	0,1M	Fenol	40%v/v	2,2,2-Trifluoroetanol
24	30%v/v	Metanol	30%v/v	Dimetil sufoxido	0,1M	DTT

A coleta foi feita com o cristal resfriado instantaneamente num fluxo de nitrogênio gasoso a aproximadamente 100 K. Isto permitiu a redução dos efeitos danosos da radiação direta e aumentou o tempo de vida do cristal. Dessa forma há um melhor aproveitamento do material, pois apenas um único cristal pode fornecer dados suficientes para a resolução da estrutura, não sendo preciso realizar a integração com dados de cristais diferentes. Assim, cada conjunto de imagens geradas de um cristal forma um conjunto de dados a ser analisado. É possível

realizar várias coletas de cristais diferentes e escolher o melhor conjunto de dados. Além disso, os dados coletados a frio apresentam melhor qualidade, pois o resfriamento mantém o nível de organização interna do cristal, necessária para uma boa coleta de dados, preservação da rede cristalina, informação expressa nos resultados pela mosaicidade.

A coleta dos dados foi realizada com registro das imagens de difração de raios-X no detector MarCCD 165 mm, com oscilação do sistema goniométrico de 1° por imagem. A distância do detector ao cristal foi regulada de forma a chegar o mais próximo possível da melhor resolução, limitada pela qualidade do cristal (~70-120 mm).

As primeiras imagens foram indexadas e integradas (processamento dos dados) utilizando o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) para determinar o grupo espacial, as dimensões e orientação da célula unitária e estimar sua mosaicidade e completeza dos dados. A partir da medida da distância e dos eixos da rede recíproca do padrão de difração é possível determinar o tamanho e os eixos do cristal no espaço real. Na indexação ocorre a identificação dos pontos de reflexão com suas respectivas intensidades e a determinação do índice de Miller de cada ponto.

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

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

suas intensidades somadas. Após esse processo, foram obtidos parâmetros para determinar a qualidade do cristal, representados pelos parâmetros da rede cristalina.

Todas as medidas de um mesmo ponto deveriam ter a mesma intensidade, mas na prática isso não acontece. O R_{merge} é um parâmetro de concordância entre as várias medidas de intensidade de uma mesma reflexão de imagens ou conjunto de dados diferentes, que indica o quanto elas concordam ou discordam. O R_{symm} , por sua vez, é um parâmetro que relaciona, da mesma forma, as medidas de intensidade de reflexões simetricamente relacionadas de imagens ou conjunto de dados diferentes (McCree, 1993).

5. RESULTADOS

5.1. Purificação do SPCI e do complexo binário

As amostras obtidas durante as etapas de produção do extrato bruto (EB) do SPCI foram analisadas por SDS-PAGE (figura 4).

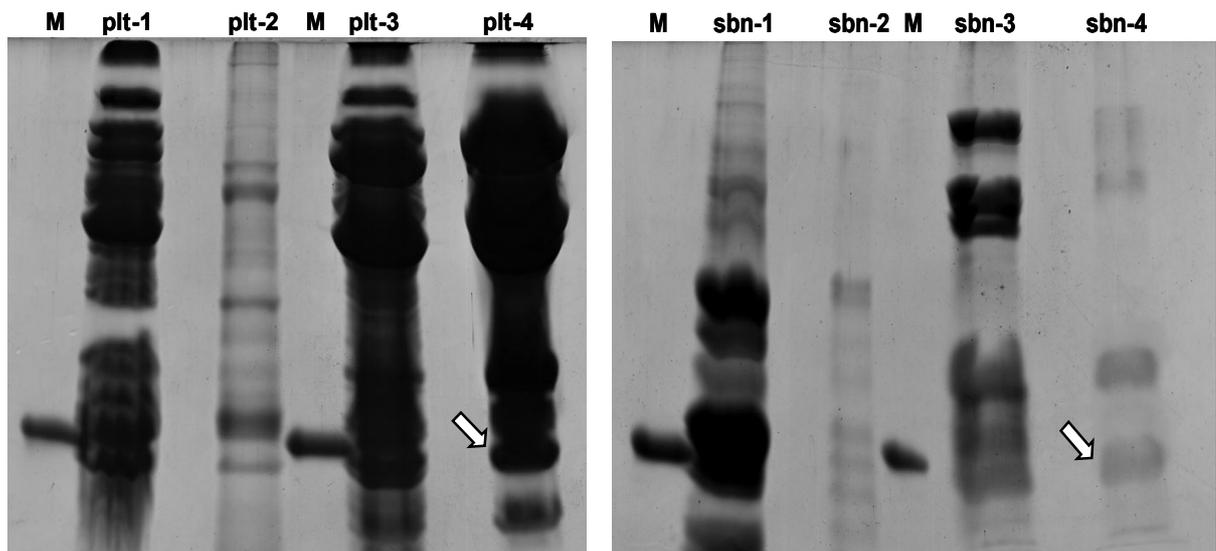


Figura 4. Gel de poli-acrilamida a 13% do EB do SPCI. **sbn-1 e plt-1**, sobrenadante e precipitado após extração das proteínas em NaCl 1%; **sbn-2 e plt-2**, sobrenadante e precipitado após extração em NaCl 1%; **sbn-3 e plt-3**, sobrenadante e precipitado após precipitação com sulfato de amônio a 60%; **sbn-4 e plt-4**, sobrenadante e precipitado após precipitação por sulfato de amônio a 70% (ver Materiais e Métodos). A seta indica a banda correspondente ao SPCI. **M**, marcador de massa molecular: somatotropina bovina recombinante: 20 kDa (Schering Plough).

O plt-4 e sbn-4 (figura 4) foram submetidos à precipitação com TCA em diferentes concentrações. As com menor número de contaminantes começam a partir de 1,2% de TCA (figura 5A e 5B).

O sobrenadante obtido a partir dessa concentração de TCA, após diálise e liofilização, foi diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,1 e aplicado na coluna cromatográfica de troca iônica. O perfil cromatográfico está apresentado na figura 6.

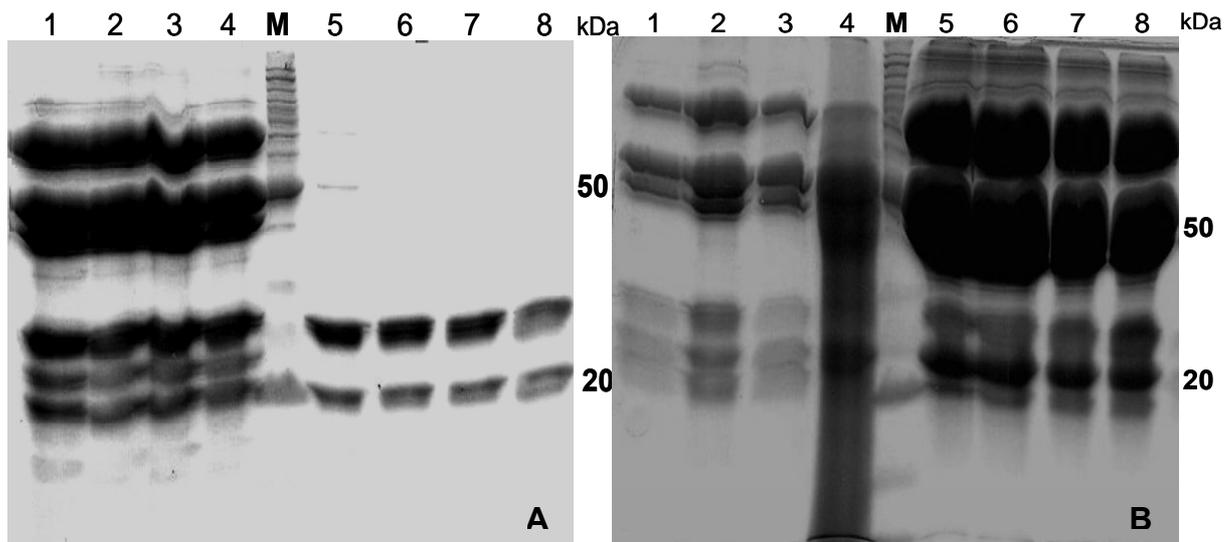


Figura 5. Gel de poliacrilamida 13% das amostras de SPCI semi-purificado. O sobrenadante e o precipitado obtidos da precipitação por TCA estão mostrados em **A** e **B**, respectivamente. Linha 1: amostras precipitadas com TCA 0,2%; linha 2: amostras precipitadas com TCA 0,4%; linha 3: amostras precipitadas com TCA 0,6%; linha 4: amostras precipitadas com TCA 0,8%; M, marcador de massa molecular: 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa (BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen; Cat. N°. 10747-012); linha 5: amostras precipitadas com TCA 1,0%; linha 6: amostras precipitadas com TCA 1,2% de TCA; linha 7: amostras precipitadas com TCA 1,4%; linha 8: amostras precipitadas com TCA 1,6%.

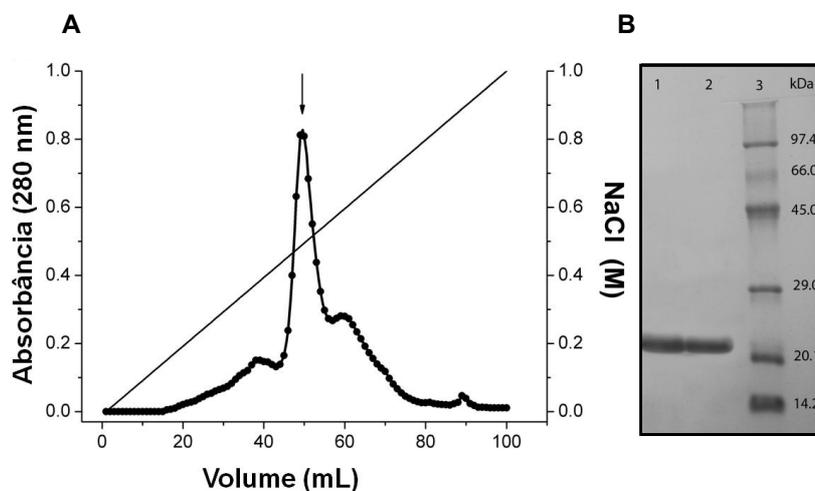


Figura 6. **(A)** Cromatograma da amostra de SPCI semi-purificado em coluna SP-Sephadex C_{25-120} . As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl. A seta indica o pico em que o SPCI foi eluído puro. **(B)** Perfil eletroforético SDS-PAGE 13% da purificação do SPCI por cromatografia de troca iônica. Linhas 1 e 2: frações de maior absorbância (SPCI puro). Linha 3: marcador de massa molecular: fosforilase b do músculo de rato (97,4 kDa), albumina do soro bovino (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1) e α -lactalbumina de leite bovino (14,2 kDa) (Amersham Pharmacia Biotech UK).

A purificação do complexo binário SPCI-quimotripsina foi realizada por cromatografia de exclusão molecular. Duas frações foram obtidas, correspondendo ao complexo purificado e às proteínas SPCI e quimotripsina nas formas livres, respectivamente (figura 7).

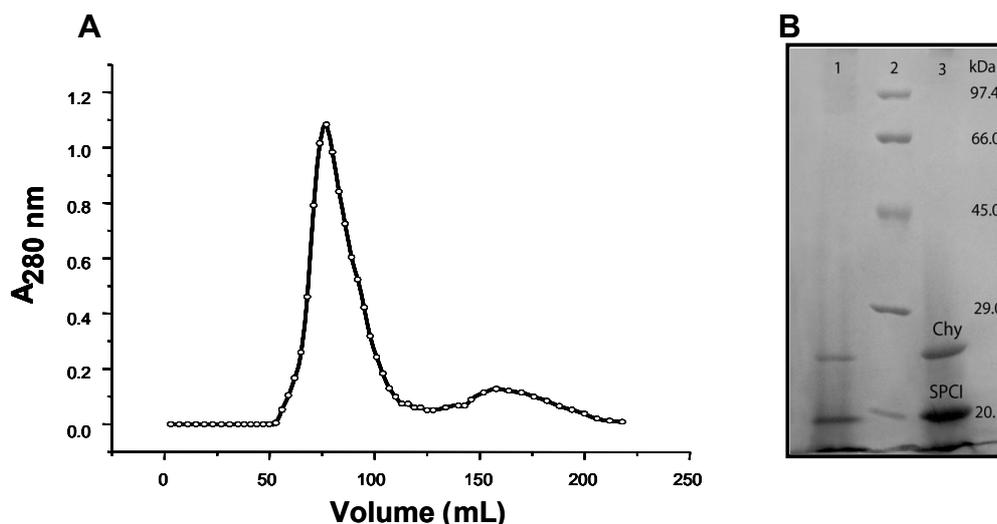


Figura 7. **(A)** Cromatograma do complexo binário SPCI-quimotripsina por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G₇₅. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 50 mM KCl 0,2 M pH 7,6. O primeiro pico corresponde ao complexo binário e o segundo ao SPCI e a quimotripsina nas formas livres. O fluxo foi de 2,5 mL.tubo⁻¹. **(B)** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 13% do complexo SPCI-quimotripsina. Linhas 1 e 3: primeira fração. Linha 2: marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia Biotech UK): fosforilase b do músculo de rato (97,4 kDa), albumina do soro bovino (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1) e α -lactoalbumina de leite bovino (14,2 kDa).

Ambas as proteínas que formam o complexo estão mostradas no gel, o qual contém duas bandas de massa molecular esperada para α -quimotripsina (25 kDa) e SPCI (21 kDa) (figura 7B).

5.2. Alterações conformacionais de SPCI com α -quimotripsina

5.2.1. Fluorescência estacionária

A interação do inibidor com a enzima reduziu a intensidade de fluorescência em todas as temperaturas estudadas sem interferir no posicionamento dos triptofanos, indicado pela banda de emissão fixa em 332 nm.

A atenuação da intensidade de fluorescência indica modificações apenas no ambiente dos triptofanos. Esses dados foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (figura 9). As constantes de atenuação de fluorescência de Stern-Volmer (K_{sv}) para essa interação estão apresentadas na tabela I. Os valores para K_{sv} foram praticamente os mesmos em todas as temperaturas estudadas. Esses dados indicam que a atenuação da fluorescência não é do tipo dinâmico nem estático, mas resultante da associação das moléculas.

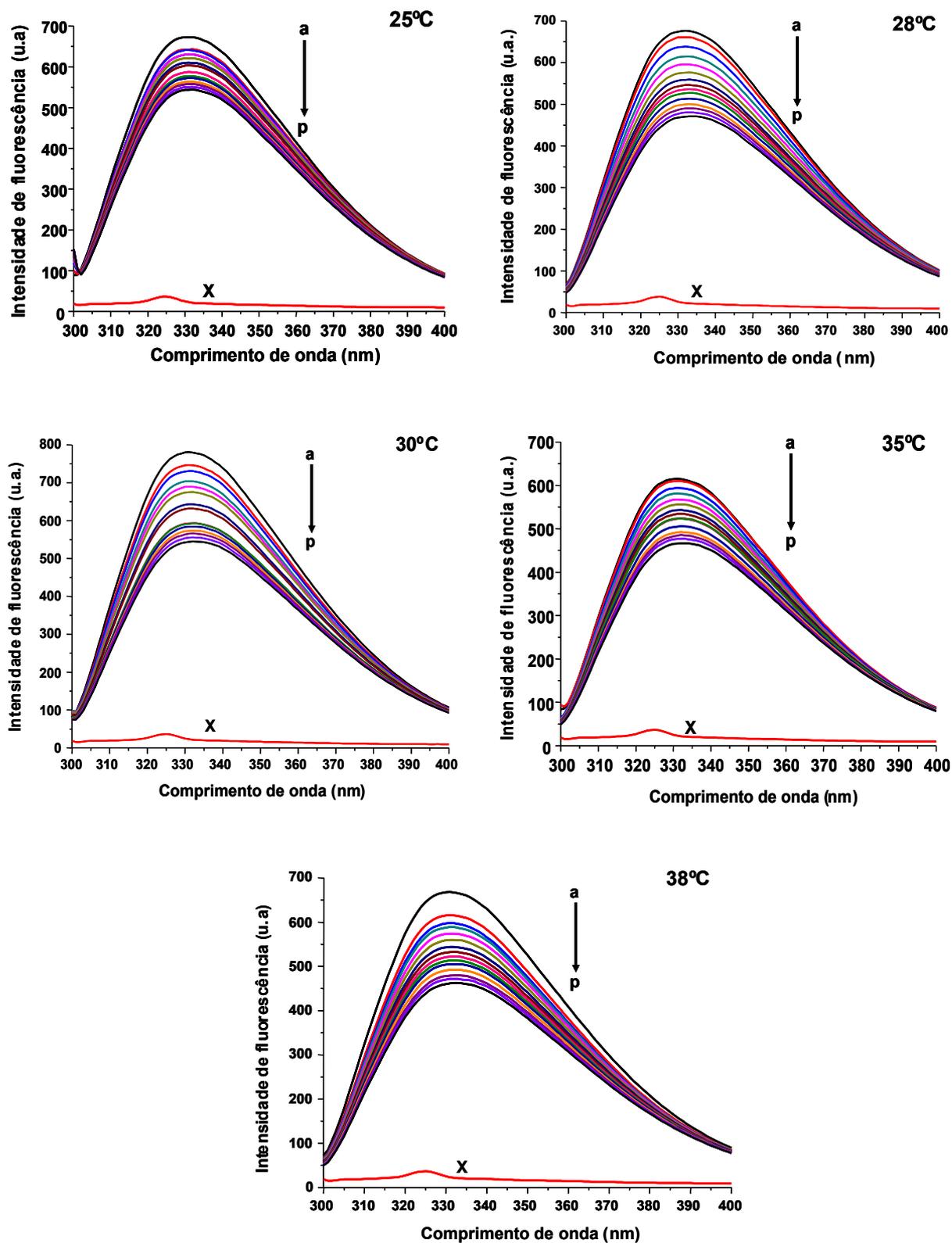


Figura 8. Espectros de emissão de fluorescência de α -quimotripsina com concentrações crescentes do SPCI, em várias temperaturas. (a) Espectros de emissão de fluorescência da α -quimotripsina com: (b) 0,043; (c) 0,087; (d) 0,13; (e) 0,215; (f) 0,299; (g) 0,382; (h) 0,463; (i) 0,543; (j) 0,622; (l) 0,7; (m) 0,776; (n) 0,856; (o) 0,926 e (p) 1 μ M de SPCI. X é o espectro de fluorescência do tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM.

A associação entre o inibidor e a enzima, a qual promoveu modificações no microambiente dos triptofanos foi analisada com mais detalhe empregando o método de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, pela medida do tempo de vida no domínio da frequência.

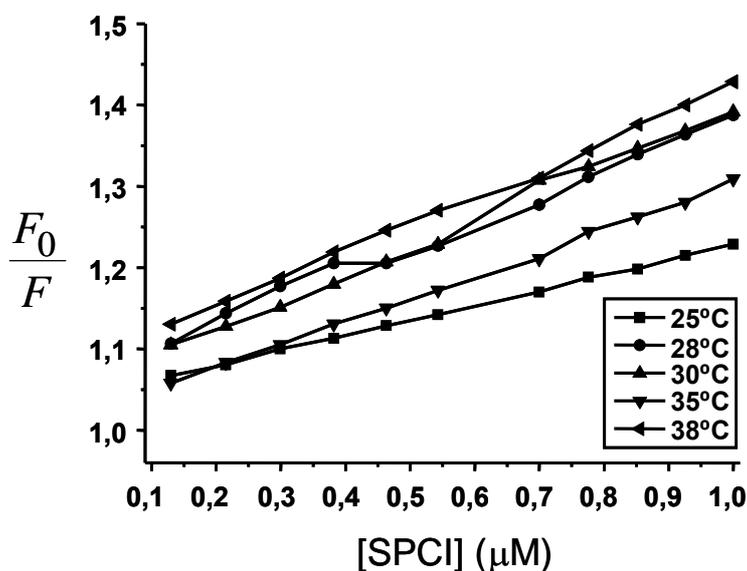


Figura 9. Gráfico de Stern-Volmer para a interação SPCI com α -quimotripsina. F_0 e F são as intensidade de fluorescência do inibidor na ausência e presença da enzima, respectivamente.

Tabela I. Constantes de atenuação de fluorescência de Stern-Volmer para a interação SPCI com α -quimotripsina em diferentes temperaturas.

pH	T (°C)	$K_{sv} (M^{-1})$	R^a	$K_q (M^{-1}.s^{-1})$	S.D. ^b
7,6	25	$3,3 \times 10^5$	0,99	$1,1 \times 10^{14}$	0,001
	28	$2,0 \times 10^5$	0,97	$1,0 \times 10^{14}$	0,010
	30	$3,0 \times 10^5$	0,98	$1,1 \times 10^{14}$	0,007
	35	$3,4 \times 10^5$	0,99	$1,1 \times 10^{14}$	0,003
	38	$3,0 \times 10^5$	0,99	$1,0 \times 10^{14}$	0,005

^aR é o coeficiente de correlação. ^bS.D. é o desvio padrão para os valores de K_{sv} .

5.2.2. Fluorescência dinâmica

As curvas e os ajustes das medidas multifrequencial do ângulo de fase e da modulação relativa das amostras do SPCI, para determinação do decaimento de fluorescência do inibidor, estão apresentadas na figura 10.

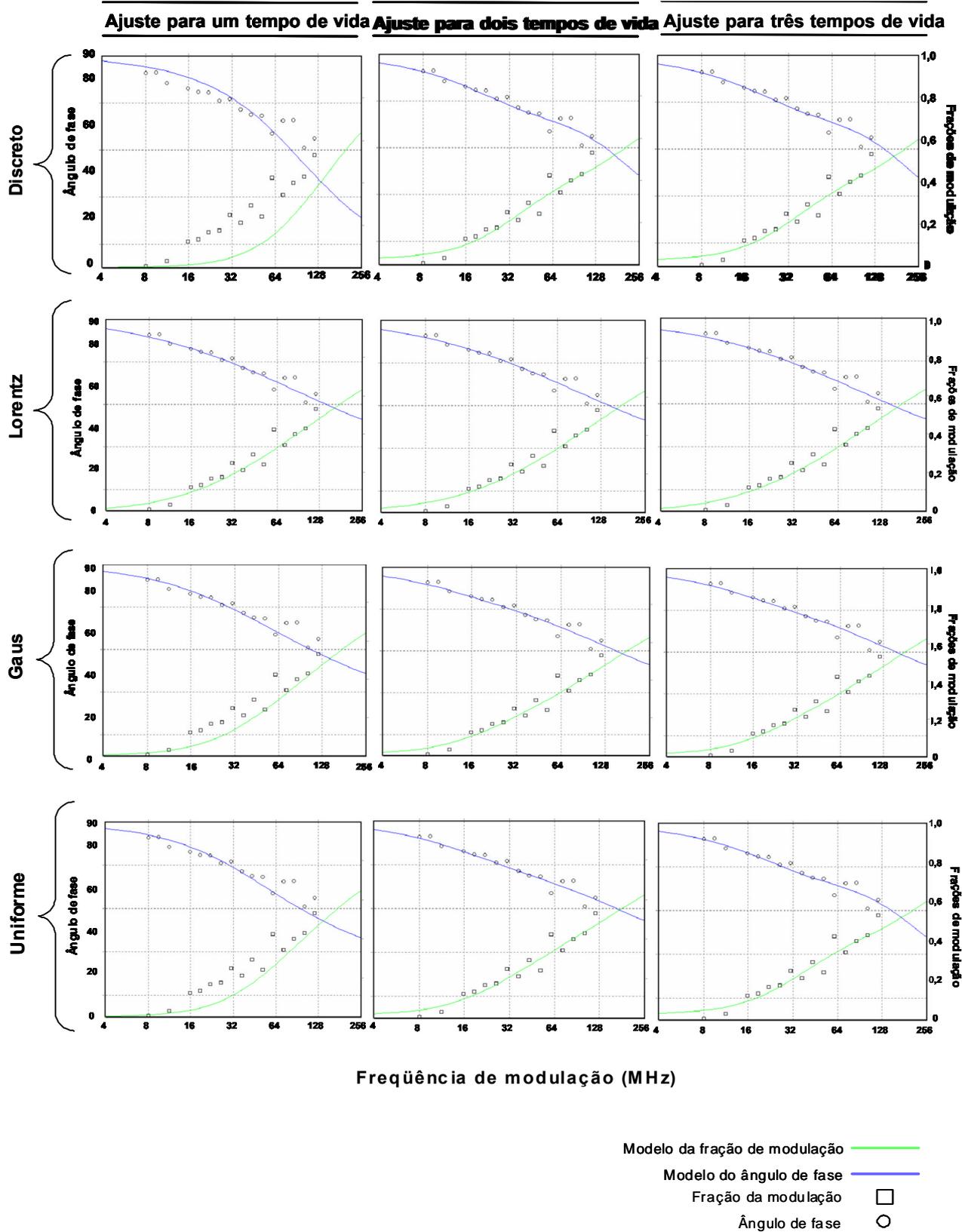


Figura 10. Modulação e fase multifrequencial do SPCI 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM ajustados em diferentes modelos. Os ajustes para o modelo *Planck* são praticamente idênticos aos do *Discreto*.

A tabela II mostra os resultados de decaimento de fluorescência obtidos a partir dos ajustes dos dados no domínio da frequência (figura 10) do SPCI.

Tabela II. Análise do tempo de vida de fluorescência do SPCI a 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM, utilizando diferentes modelos de ajuste.

Tempos de vida (nanossegundos)															
Modelos	Ajuste para um tempo de vida			Ajuste para dois Tempos de vida					Ajuste para três Tempos de vida						
	τ	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	τ_3 (f_3)	\pm	χ^2
Discreto	1,61	0,004	201	0,678 (0,518)	0,02 (0,01)	4,98 (0,453)	0,2 (0,01)	25,7	0,678 (0,518)	0,02 (0,01)	4,98 (0,454)	0,2 (0,01)	2911 ($2,29 \times 10^{-8}$)	5×10^1 (0)	27,7
Planck	1,61	0,004	201	0,678 (0,519)	0,02 (0,01)	4,98 (0,453)	0,2 (0,02)	25,7	0,679 (0,519)	0,02 (0,01)	4,98 (0,453)	0,2 (0,01)	1347 ($8,37 \times 10^{-9}$)	0 (0)	27,7
Lorenz	$6,5 \times 10^{-6}$	0,03	153	$1,4 \times 10^{-7}$ (0,989)	0,01 (0,003)	4,57 (0,015)	2×10^6 (40)	174	$1,15 \times 10^{-5}$ (0,901)	0,3 (0,04)	8,04 (0,096)	0,6 (0,04)	122 ($1,3 \times 10^{-7}$)	3×10^1 (0,02)	204
Gaus	$5,9 \times 10^{-8}$	0,005	333	8×10^{-6} (0,413)	0,4 (0,2)	2,64 (0,577)	5 (0,2)	162	$1,36 \times 10^{-6}$ (0,412)	0,08 (0,02)	7,54 (0,273)	0,3 (0,02)	$1,32 \times 10^{10}$ ($9,52 \times 10^{-6}$)	6×10^8 (1)	184
Uniforme	1,71	3×10^{-8}	498	0,637 (0,367)	1000 (0,2)	4,04 (0,615)	2000 (0,2)	165	0,512 (0,713)	30 (0,01)	8,09 (0,276)	0,3 (0,01)	$1,17 \times 10^4$ ($3,89 \times 10^{-6}$)	0 (0,5)	196

τ representa o tempo de vida de fluorescência. χ^2 é o desvio padrão ("chi-square") reduzido para os ajustes. f é a contribuição fracional da emissão de fluorescência.

Os modelos *Lorenz* e *Gaus* apresentaram ajuste fora dos padrões de qualidade, o que é indicado pelos valores mais baixo de χ^2 . No caso dos ajustes para dois tempos de vida, os modelos *Lorenz*, *Gaus* e *Uniforme* apresentam altas variações de erro no τ_2 para dois tempos de vida, em relação aos modelos *Discreto* e *Planck*. Desses modelos, *Lorenz* [$\tau_2 (\pm) = 2 \times 10^6$] e *Uniforme* [$\tau_2 (\pm) = 2000$ e $\tau_1 (\pm) = 1000$] são os que apresentam maiores variações de erro. Uma diminuição no χ^2 foi obtida pelos modelos do tipo *Discreto* e de *Planck*.

Nestes últimos modelos não houve alteração na contribuição da emissão de fluorescência (f_1), quer para um ou dois tempos de vida, apresentando uma contribuição fracional da intensidade de fluorescência de praticamente 50% para ambos os tempos de vida (τ_1 e τ_2).

Os dados obtidos para a α -quimotripsina foram ajustados com os mesmos modelos de ajuste obtidos para o SPCI (figura 11). Os valores de tempo de vida e χ^2 para todos os modelos estão apresentados na tabela III.

A maioria dos modelos utilizada para o ajuste dos decaimentos de fluorescência da enzima foram aqueles considerando dois tempos de vida (tabela III). O modelo *Uniforme* apresenta a maior variação de erro entre todos os modelos utilizados. O modelo *Discreto* (ou *Planck*) ainda apresenta uma baixa variação de erro e um χ^2 menor em relação aos demais. Esses modelos ajustados para dois tempos de vida parecem os mais adequados para o estudo da interação entre SPCI e α -quimotripsina.

Tabela III. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da α -quimotripsina. A enzima (50 μ M) foi mantida no mesmo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 90 mM.

Modelos	Tempos de vida (nanosegundos)														
	Ajuste para um tempo de vida			Ajuste para dois Tempos de vida					Ajuste para três tempos de vida						
	τ	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	τ_3 (f_3)	\pm	χ^2
Discreto	2,15	0,004	621	0,91 (0,368)	0,01 (0,006)	4,15 (0,633)	0,05 (0,005)	15,4	0,914 (0,37)	0,01 (0,006)	4,17 (0,633)	0,05 (0,005)	143 ($1,48 \times 10^{-7}$)	10^7 (0,02)	16,4
Planck	2,15	0,004	621	0,91 (0,368)	0,01 (0,005)	4,15 (0,635)	0,04 (0,005)	15,4	0,922 (0,37)	0,01 (0,005)	4,2 (0,629)	0,05 (0,005)	131 ($1,57 \times 10^{-7}$)	10^7 (0,01)	16,4
Lorenz	2,12	0,008	27,4	1,11 (0,451)	0,05 (0,03)	4,47 (0,1)	0,1 (0,02)	15,5	1,11 (0,453)	0,1 (0,06)	4,47 (0,554)	0,2 (0,06)	$1,53 \times 10^4$ ($8,03 \times 10^{-5}$)	0 (1)	17,1
Gaus	2,39	0,01	20,5	1,15 (0,445)	0,06 (0,02)	4,47 (0,562)	0,1 (0,02)	15,7	1,15 (0,444)	0,09 (0,04)	4,47 (0,562)	0,1 (0,04)	64,5 ($2,7 \times 10^{-9}$)	0 (0)	17,3
Uniforme	2,44	5	35,4	1,27 (0,41)	8×10^4 (9000)	1,16 (0,602)	5×10^4 (9000)	36,7	0,026 (0,412)	2000 (1000)	0,425 (0,602)	2000 (1000)	157 ($4,68 \times 10^{-8}$)	10^3	40,1

A interação do SPCI com a α -quimotripsina foi realizada titulando o inibidor com a enzima. Os ajustes foram feitos para cada fração da titulação. As figuras 12 e 13 mostram os ajustes em dois momentos: primeira e última titulação, respectivamente. Todas as frações tituladas foram ajustadas e analisadas (dados não mostrados), e o modelo que melhor descreveu (χ^2 e erros reduzidos) o decaimento de fluorescência para a interação das moléculas foram o *Discreto* e o *Planck* (ajuste para dois tempos de vida). Os resultados obtidos dos ajustes das curvas mostradas nas figuras 12 e 13 estão apresentados nas tabelas IV e V, respectivamente.

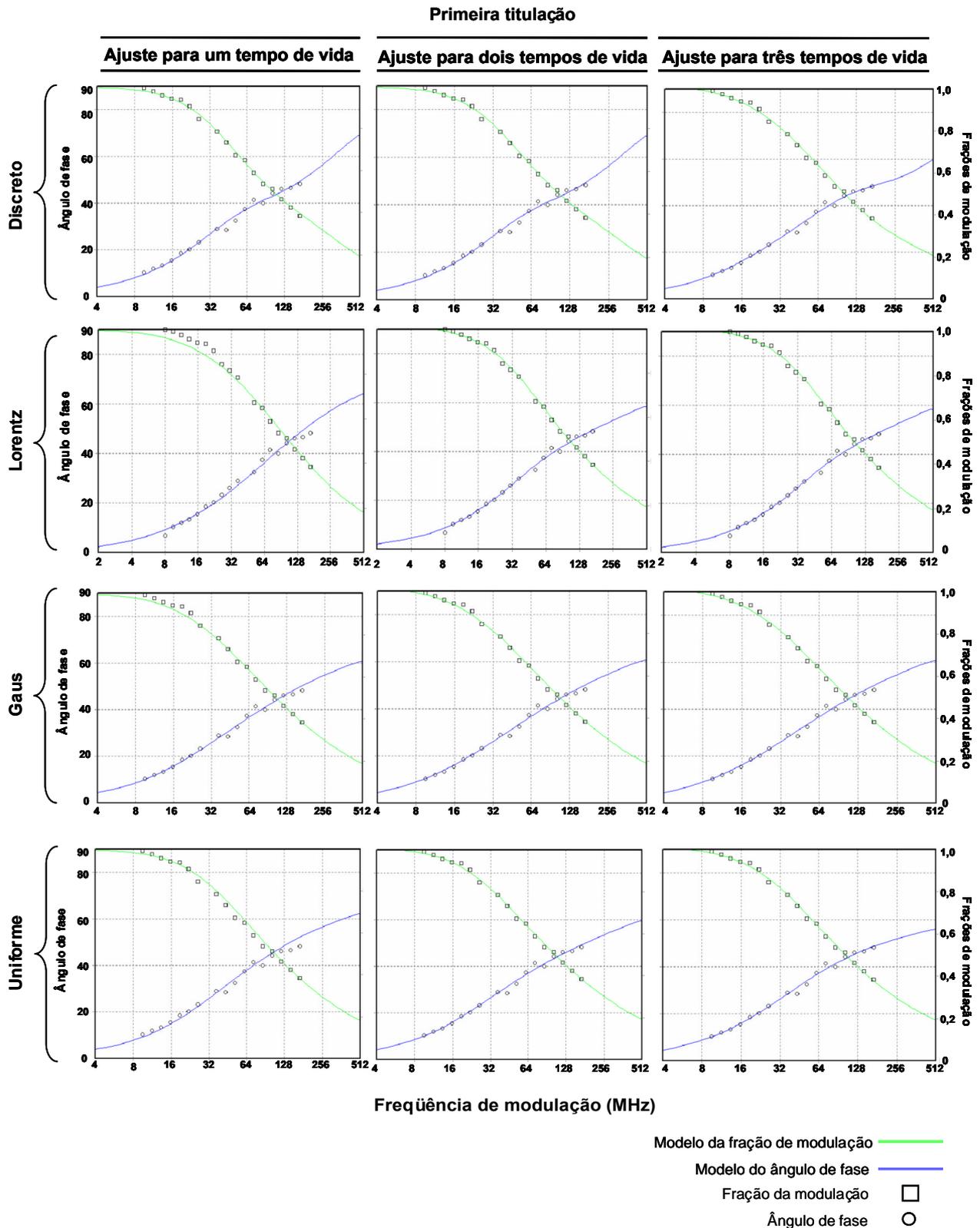


Figura 12. Modulação e fase multifreqüencial para a interação do SPCI com a α -quimotripsina em diferentes modelos. Estes ajustes obtidos advêm apenas da primeira titulação (adição de $1\mu\text{L}$ da α -quimotripsina na solução de SPCI, equivalendo a $1,85\mu\text{M}$ da enzima na solução). O modelo *Planck* apresentou ajustes e valores idênticos aos do modelo *Discreto*, por isso não está mostrado na figura. Os ângulos de fase e as frações de modulação estão apresentados como uma função da modulação de frequência a 25°C .

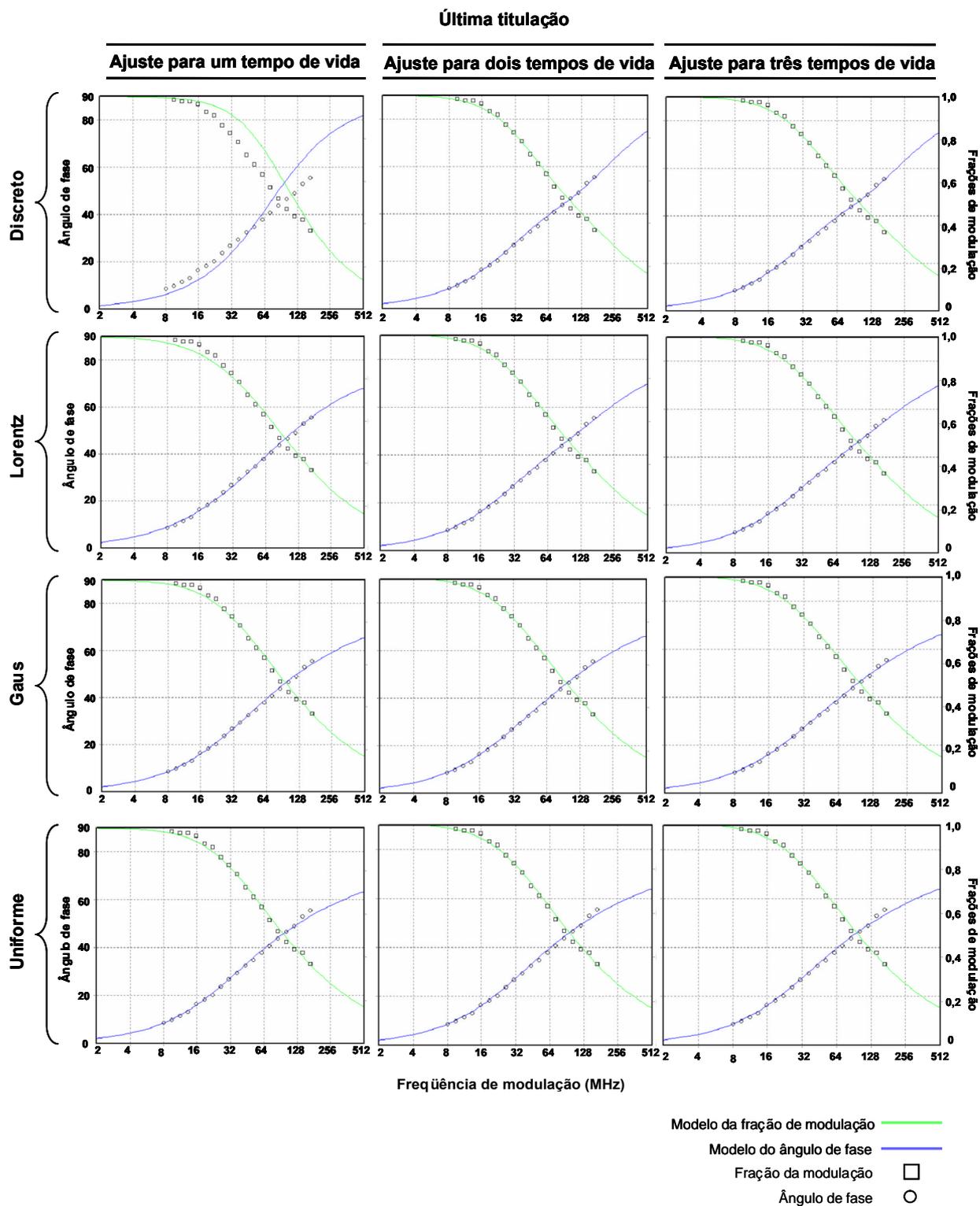


Figura 13. Modulação e fase para a interação do SPCI com a α -quimotripsina em diferentes modelos. Estes ajustes obtidos advêm apenas da última titulação (adição de $25\mu\text{L}$ da α -quimotripsina na solução de SPCI, equivalendo a $50\mu\text{M}$ da enzima na solução). O modelo *Planck* apresenta ajustes e valores idênticos ao do *Discreto*, por isso não está apresentado na figura. Os ângulos de fase e as frações de modulação estão apresentados como uma função da modulação de frequência a 25°C .

Tabela IV. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da interação SPCI-quimotripsina da primeira titulação.

Modelos	Tempos de vida (nanosegundos)														
	Ajuste para um tempo de vida			Ajuste para dois Tempos de vida					Ajuste para três tempos de vida						
	τ	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	τ_3 (f_3)	\pm	χ^2
Discreto	1,96	0,01	154	0,697 (0,334)	0,02	4,06 (0,667)	0,08	5,94	0,697 (0,334)	0,02	4,06 (0,667)	0,08	$7,93 \times 10^4$	0	6,31
Planck	1,96	0,01	154	0,697 (0,334)	0,02	4,06 (0,667)	0,08	5,94	0,697 (0,334)	0,02	4,06 (0,667)	0,08	$7,93 \times 10^4$	0	6,31
Lorenz	1,64	0,01	59,1	0,188 (0,601)	0,2	3,98 (0,419)	0,2	17	0,183 (0,598)	0,2	3,98 (0,421)	0,2	146 ($6,65 \times 10^{-8}$)	4×10^7	18,9
Gaus	1,05	0,06	40,4	0,894 (0,399)	0,09	4,35 (0,607)	0,1	38,5	0,894 (0,398)	0,1	4,38 (0,608)	0,2	128 ($5,38 \times 10^{-8}$)	4×10^7	42,5
Uniforme	2,59	8	199	0,869 (0,537)	30	4,91 (0,472)	0,5	39,8	0,888 (0,539)	30	4,94 (0,471)	0,7	194 ($2,85 \times 10^{-8}$)	0	44

Tabela V. Análise dos dados de tempo de vida de fluorescência da interação SPCI-quimotripsina da última titulação.

Modelos	Tempos de vida (nanosegundos)														
	Ajuste para um tempo de vida			Ajuste para dois Tempos de vida					Ajuste para três tempos de vida						
	τ	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	χ^2	τ_1 (f_1)	\pm	τ_2 (f_2)	\pm	τ_3 (f_3)	\pm	χ^2
Discreto	2,21	0,01	96,7	0,886 (0,333)	0,03	4,15 (0,651)	0,1	2,15	0,866 (0,353)	0,03	4,16 (0,651)	0,1	$1,45 \times 10^3$ ($4,86 \times 10^{-10}$)	0	2,29
Planck	2,21	0,01	96,7	0,886 (0,333)	0,03	4,16 (0,651)	0,1	2,15	0,866 (0,353)	0,03	4,16 (0,651)	0,1	$1,45 \times 10^3$ ($4,86 \times 10^{-10}$)	0	2,29
Lorenz	2,13	0,008	29,3	1,15 (0,476)	0,07	4,53 (0,532)	0,1	2,96	1,16 (0,484)	0,2	4,54 (0,523)	0,3	49,3 ($1,39 \times 10^{-8}$)	0,008	14,6
Gaus	2,30	0,02	15,3	1,73 (0,697)	0,6	5,43 (0,314)	1	14,2	1,73 (0,70)	0,7	5,40 (0,310)	1	136 ($8,16 \times 10^{-9}$)	0	15,7
Uniforme	0,640	7	17	0,312 (0,976)	0,9	2,20 (0,0327)	6×10^3	16,5	0,349 (0,976)	100	1,89 (0,035)	500	1,97 (0,002)	0	18,2

Neste trabalho foram feitos três ensaios experimentais de interação do SPCI com a α -quimotripsina: SPCI em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 , na presença de 0,2 M de NaCl e com suas ligações dissulfeto reduzidas (DTT 2 mM). As modificações no ambiente do triptofano devido à associação entre as moléculas em estudo, detectadas pelo método espectroscópico de fluorescência estacionária, foram também monitoradas pela alteração no tempo de vida de fluorescência. Essas alterações foram observadas por meio das variações na constante de atenuação da fluorescência de Stern-Volmer (K_{sv}), utilizando a equação clássica de Stern-Volmer.

A figura 14 mostra o gráfico de Stern-Volmer a partir dos dados de titulação do SPCI a 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com a α -quimotripsina. O gráfico pode ser dividido em dois componentes: descendente e ascendente. No primeiro caso a curva mostra que nessas concentrações da enzima

não ocorre atenuação do tempo de vida de fluorescência. A análise dos dados da segunda parte do gráfico (figura 14) pela equação de Stern-Volmer, mostra que a atenuação no tempo de vida de fluorescência ocorre a partir de 20 μM de α -quimotripsina, com o $K_D = 1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. O inverso de K_D é a concentração do atenuador na qual 50% da intensidade de emissão do fluoróforo é atenuada (Lakowicz, 2004). No caso do SPCI, α -quimotripsina na concentração de 0,9 mM foi necessária para atenuar 50% da emissão de fluorescência.

O valor de K_D e o tempo de vida do SPCI ($\tau_0 = 0,679 \text{ ns}$) (selecionado com base no valor mais alto da amplitude (Shaikh *et al.*, 2006) foram utilizados para calcular a constante da taxa de atenuação de fluorescência bimolecular ($K_q = 1,63 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), a qual reflete a eficiência da atenuação do tempo de vida. A mesma ordem de grandeza foi mantida ($4,24 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), baseado na média do tempo de vida (Shashidhara *et al.*, 2007).

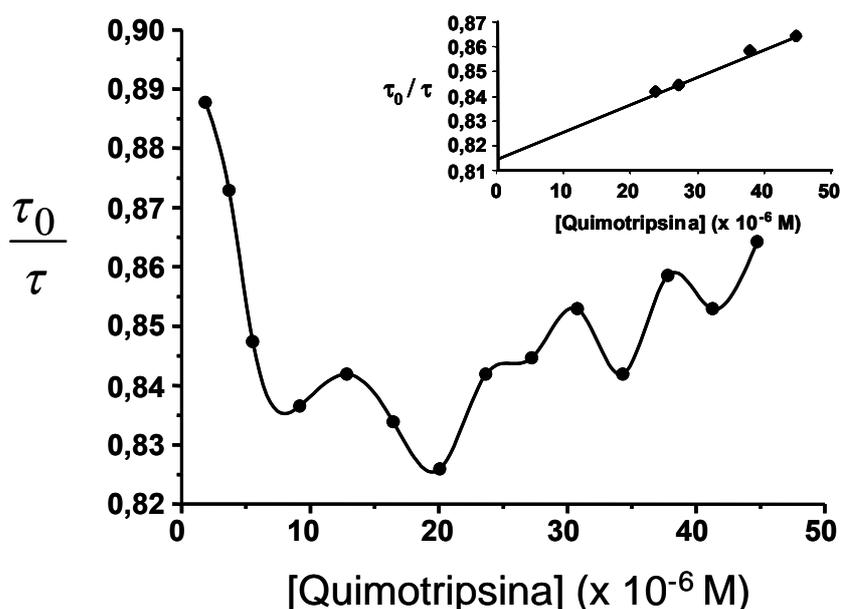


Figura 14. Gráfico de Stern-Volmer apresentando os dados da interação do SPCI com a quimotripsina a 25°C. A solução de SPCI está fixada em 50 μM . A representação da atenuação do tempo de vida (parte ascendente do gráfico) está mostrada no gráfico superior à direita, conforme equação de Stern-Volmer ($R^2 = 0,99$). τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e na presença da enzima, respectivamente.

Os dados obtidos do segundo experimento, onde a solução de SPCI 100 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM e NaCl 0,2 M interage com a α -quimotripsina, estão analisados conforme o gráfico de Stern-Volmer (figura 15).

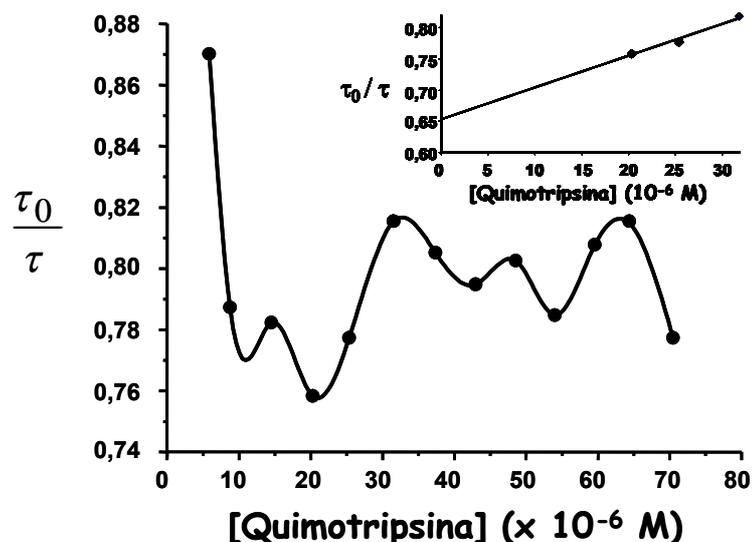


Figura 15. Gráfico de Stern-Volmer. SPCI 100 μ M em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6 CaCl₂ 50mM com NaCl 0,2M a 25°C. A representação da atenuação do tempo de vida (20 μ M a 32 μ M da enzima) está mostrada no gráfico superior à direita, conforme equação de Stern-Volmer ($R^2=0,98$). τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e na presença da enzima, respectivamente.

O processo de atenuação do tempo de vida ocorre de 20 a 32 μ M de α -quimotripsina (figura 15). Os valores das constantes K_D e k_q obtidos foram de $5,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente (SPCI, $\tau_0 = 0,43 \text{ ns}$). O mesmo cálculo foi realizado com o tempo de vida médio ($\langle \tau \rangle = 2,5 \text{ ns}$) do inibidor, obtendo um valor de K_q da mesma ordem de grandeza ($2,0 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A concentração da enzima necessária para atenuar 50% do tempo de vida de fluorescência do SPCI na condição estudada é de aproximadamente 0,2 mM. No entanto, a partir de 32 μ M da enzima ocorre uma flutuação entre aumento e redução da atenuação do tempo de vida de fluorescência.

As mesmas condições realizadas no experimento anterior (figura 15) foram mantidas no próximo ensaio, porém adicionando DTT a 2 mM. Este ensaio consistiu na titulação do SPCI (ligações dissulfeto reduzidas) pela enzima para verificar o papel dessas ligações na interação (figura 16) (terceiro experimento), considerando que este inibidor continua apresentando atividade inibitória mesmo com suas ligações dissulfeto reduzidas (Souza *et al.*, 2000).

O rompimento das ligações dissulfeto promoveu flutuações, intercalando presença e ausência de atenuação no tempo de vida (figura 16). As modificações nas estruturas secundárias do inibidor, na sua forma nativa e sem ligações

dissulfeto, foram monitoradas por dicroísmo circular. Esse ensaio permitiu analisar e comparar as mudanças conformacionais que ocorrem durante a formação do complexo e devido à redução das ligações dissulfeto.

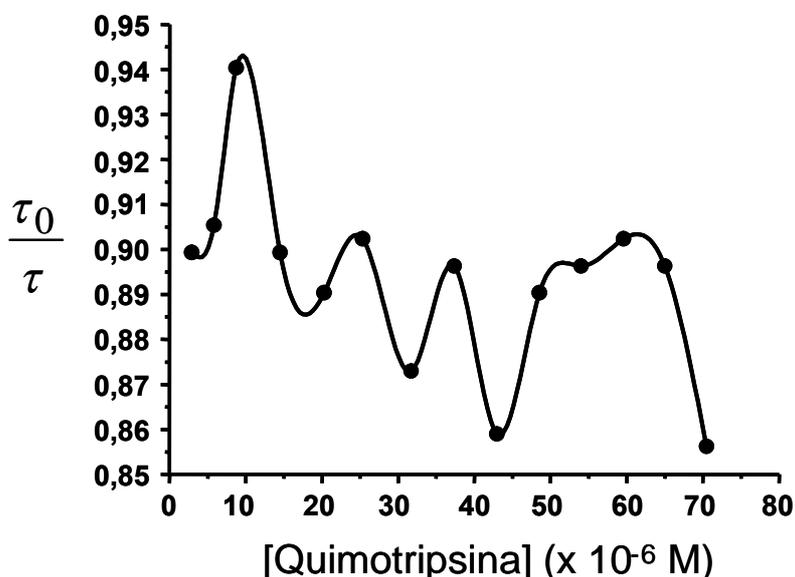


Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer. O SPCI a 100 μ M foi dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM contendo CaCl_2 50 mM e NaCl 0,2M com suas ligações dissulfeto reduzidas (DTT 2mM). τ_0 e τ são os tempos de vida de fluorescência do SPCI na ausência e presença da α -quimotripsina.

5.3. Estabilidade estrutural do SPCI

A figura 17 mostra espectros de dicroísmo circular “Distante do UV” (260 a 190 nm) do SPCI em tampão HEPES 2 mM pH 7,5 contendo NaCl 0.2 M e DTT 2 mM. O espectro dicróico a 25°C indica que o SPCI, nestas condições, apresenta predominância de estruturas desordenadas (“random coil”) e folhas β anti-paralelas. À medida que aumenta a temperatura, o conteúdo de α -hélice aumenta e o da folha β anti-paralela diminui. A folha β paralela, voltas- β e estrutura desordenada apresentaram menores flutuações em relação às outras estruturas nas temperaturas do experimento (tabela VI).

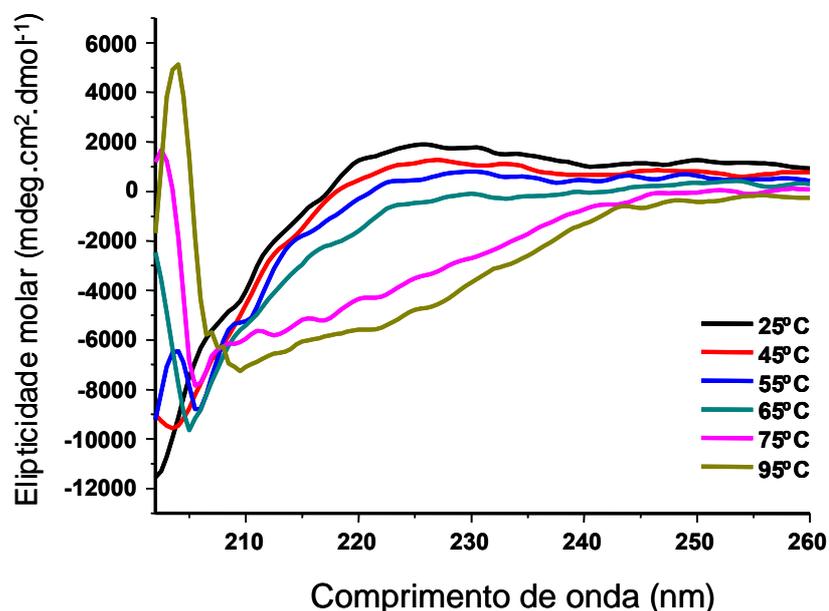


Figura 17. Espectros de dicroísmo circular “distante do UV” do SPCI em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl₂ 0,2 M e DTT 2 mM. A melhor concentração do inibidor (HT[V] < 700) para realizar o experimento foi de 0,073 mg.mL⁻¹.

Tabela VI. Porcentagem das estruturas secundárias do SPCI (0,073 mg.mL⁻¹) em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M e DTT 2 mM.

Estrutura secundária	Temperatura (°C)					
	25	45	55	65	75	95
α-hélice	3,3	3,6	4,2	5,1	9,4	12,8
Folha β anti-paralela	41,1	38,9	37	34,4	27,9	25,7
Folha β paralela	5,0	5,0	5,1	5,1	5,4	5,6
Voltas-β	24,8	25,3	25	24,8	21,7	18,4
Desordenadas	35,9	35,8	35,8	35,7	35,2	34,2

A curva de desnaturação térmica do SPCI nas condições acima mencionadas esta apresentada na figura 18. O gráfico mostra que o SPCI não desnaturou até a temperatura de 95°C o que não permitiu calcular os parâmetros termodinâmicos. Nas temperaturas de 70°C em diante ocorrem transições conformacionais, sendo mais pronunciadas de 87 para 90°C, indicando precipitação da proteína.

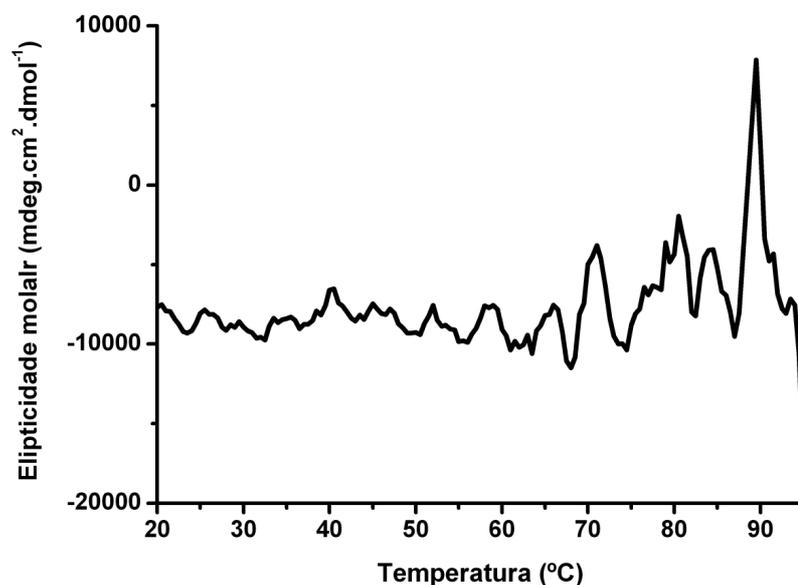


Figura 18. Desnaturação térmica do SPCI com as ligações dissulfeto reduzidas. SPCI 0,073 mg.mL⁻¹ em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M e DTT 2 mM. Comprimento de onda fixado em 201 nm.

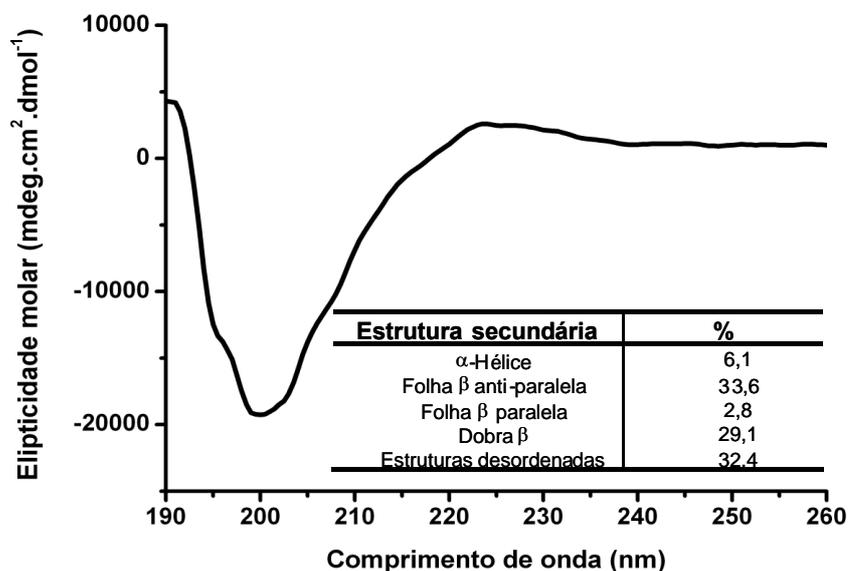


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular “distante do UV” do SPCI na forma nativa em tampão Hepes 2 mM pH 7,5. A tabela inserida mostra a percentagem das estruturas secundárias a 25°C.

O espectro dicróico do SPCI em tampão Hepes 2 mM pH 7,5 a 20°C na ausência de sal e DTT é mostrado na figura 19. Nessa temperatura, a presença de estruturas desordenadas e folhas β anti-paralelas predomina entre as estruturas secundárias.

5.4. Medidas do estado de oligomerização do inibidor em solução

A tabela VII mostra os dados obtidos por ELD da solução de SPCI, variando a concentração.

Tabela VII. Dados de espalhamento de luz dinâmica da solução de SPCI em tampão Tris-HCl 50 mM contendo CaCl₂ 50 mM pH 7,6, variando a concentração, a 25°C.

Concentração (μM)	Medidas	Raio (nm)	Pd ^a (%)	Mm ^b (kDa)	Massa (%)
25	1	0,074684	0	0,00777601	99,8453
	2	0,400059	0	0,394664	0,13319
	3	2,14811	30,5891	20,143	0,0214593
50	1	0,0710157	0	0,00691159	99,9451
	2	2,16167	30,6389	20,4419	0,0549026
	3	43,207	23,3913	22596,8	8,03544 x 10 ⁻⁷
75	1	0,0746834	0	0,00777587	99,899
	2	2,13975	33,5904	19,9601	0,100989
100	1	0,0710157	0	0,00691159	99,9093
	2	2,30565	29,1169	23,7706	0,0907243
	3	50,2479	40,4075	32170,2	1,96815 x 10 ⁻⁶

^a Polidispersividade. ^b Massa molecular.

Na tabela VII duas situações características podem ser observadas. A primeira é a detecção de uma massa molecular extremamente alta (ordem de grandeza: 10⁴ kDa, ou mais) com uma percentagem da ordem de 10⁻⁶, ou menos (por exemplo: medida 3, a 50°C). A segunda é um raio hidrodinâmico abaixo de 0,5 com um percentual de massa próximo de 100% (por exemplo: medida 1, a 25°C). Esta situação foi registrada em outros ensaios, com a variação da temperatura (tabela IX) e pH (tabela XI) (os gráficos residuais dos dados apresentados na tabela VII estão mostrados na figura 20).

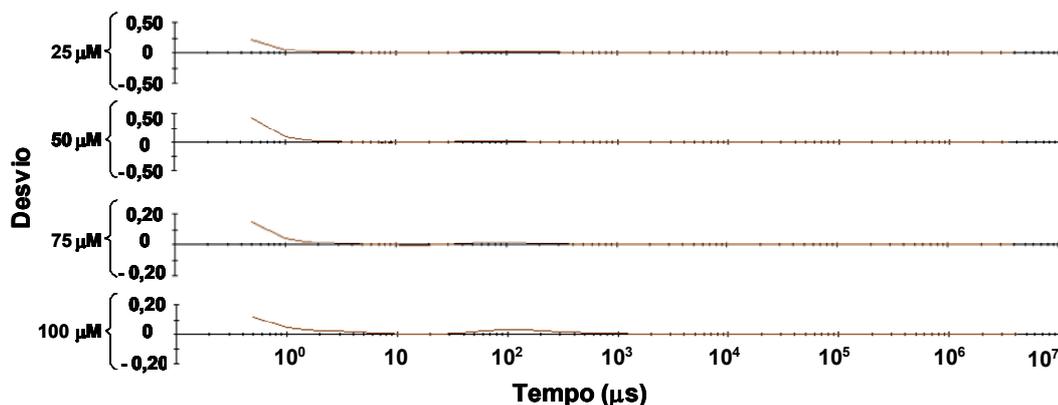


Figura 20. Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI, variando a concentração.

As duas condições mencionadas acima podem ser ignoradas ou excluídas, mantendo a medida onde corresponda a dados hidrodinâmicos da molécula em estudo (Borgstahl, 2007). Nesse sentido, a figura 21 mostra os dados para o SPCI considerando o percentual de massa e a variação do raio.

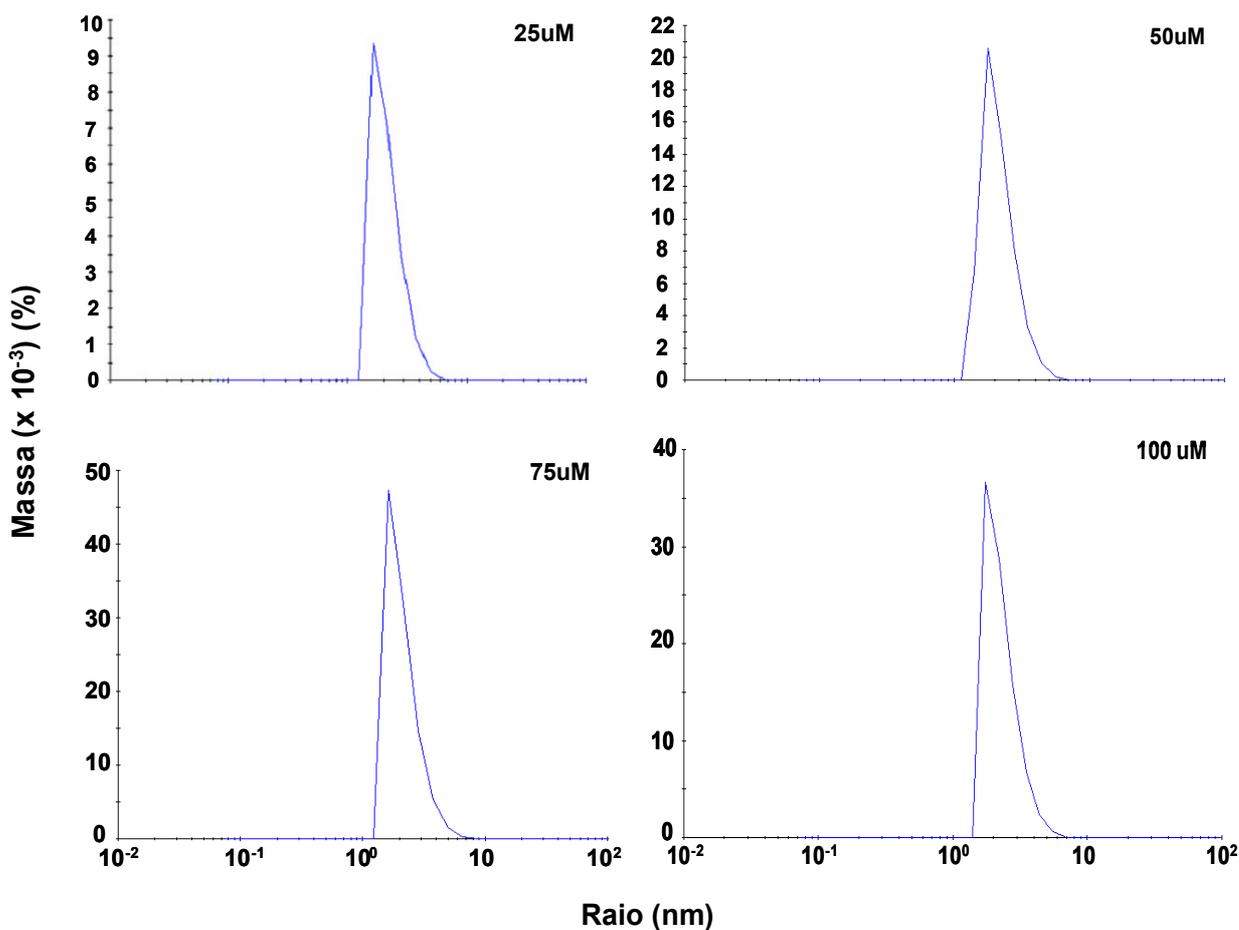


Figura 21. Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula, variando a concentração. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.

Os dados de oligomerização do SPCI mostrados na figura 21 estão acrescidos dos parâmetros “Baseline” e “SOS” para análise do número de formas moleculares do inibidor (monomodal, bimodal e multimodal) e da qualidade dos dados (nível de erro), respectivamente (tabela VIII). O mesmo procedimento de ajuste foi realizado para outros ensaios utilizando ELD.

Tabela VIII. Análise dos dados ajustados de ELD do SPCI em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 50 mM pH 7,6 a 25°C, variando a concentração.

Conc. (μM)	Raio (nm)	Mm (kDa)	D (cm ² .s ⁻¹)	Pd (%)	“Baseline”	SOS
25	2,12	19,64	1,13 x 10 ⁻⁶	30,12	0,999	149,206
50	2,16	20,44	1,11 x 10 ⁻⁶	30,63	1,000	80,321
75	2,10	20,00	1,12 x 10 ⁻⁶	33,59	1,000	47,937
100	2,30	23,77	1,04 x 10 ⁻⁶	29,11	1,000	85,450

Massa molecular de SPCI: 20 kDa. Raio de Stokes: 2,1 nm. Coeficiente de difusão a 20°C em água (D_{20,w}): 1,02 x 10⁻⁶ cm².s⁻¹ (Dados obtidos por Souza *et al.*, 1992). **D** é o coeficiente de difusão.

Nas concentrações de 25 a 75 μM os valores da polidispersividade ultrapassaram 30%, caracterizando a solução significativamente polidispersa. Apenas na concentração de 100 μM a polidispersividade foi moderada. Em todas as concentrações, o “Baseline” indica uma distribuição monomodal, isto é, existe apenas uma única forma molecular do SPCI.

Os dados do ensaio de ELD do SPCI, variando a temperatura, estão apresentados na tabela IX. Os gráficos residuais desses dados, a distribuição da percentagem de massa e tamanho (regularização gráfica), bem como a análise do número de formas moleculares distribuídos na solução estão, respectivamente, nas figura 22, 23 e tabela X.

A tabela IX mostra apenas a variação da temperatura para SPCI a 50 μM. Os experimentos variando a temperatura (4, 10, 25, 30, 40, 50 e 60°C) para todas as concentrações do inibidor (25, 50, 75 e 100 μM) foram realizados (dados não mostrados), apresentando resultados semelhantes aos encontrados na tabela IX.

Em todas as temperaturas, a solução de SPCI apresentou distribuição monomodal. Nas temperaturas 4, 10 e 50°C a solução do inibidor apresentou característica de polidispersividade moderada, a 25 e 30°C de alta polidispersividade e, finalmente, a 60°C, o resultado é típico de uma solução monodispersa (figura 23), indicando alta probabilidade de cristalização.

Tabela IX. Espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI a 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com a variação da temperatura.

Temperatura (°C)	Medidas	Raio (nm)	Pd (%)	Mm (kDa)	Massa (%)
4	1	0,0371958	0	0,00152202	99,7764
	2	0,232993	0	0,111401	0,214138
	3	2,43808	22,6798	27,089	0,00951009
10	1	0,0456323	0	0,00245552	99,9379
	2	0,452203	0	0,525688	0,0486728
	3	2,46136	22,29	27,698	0,013429
25	1	0,0710157	0	0,00691159	99,9451
	2	2,16167	30,6389	20,4419	0,0549026
	3	43,207	23,3913	22596,8	$8,03544 \times 10^{-7}$
30	1	0,0859814	10,5562	0,0108118	99,8899
	2	2,0148	35,3671	17,3388	0,11013
40	1	0,101516	0	0,0159464	99,8867
	2	2,12374	31,3655	19,6123	0,113293
	3	778,345	0	$1,95859 \times 10^7$	$2,57928 \times 10^{-7}$
50	1	0,12463	0	0,0257703	99,8333
	2	2,28288	23,3963	23,2252	0,166728
	3	955,571	0	$3,16518 \times 10^7$	$1,32868 \times 10^{-5}$
60	1	0,147753	0	0,0383758	99,7745
	2	2,47407	10,64	28,0339	0,225487
	3	14,5097	0	1758.84	$2,43044 \times 10^{-5}$

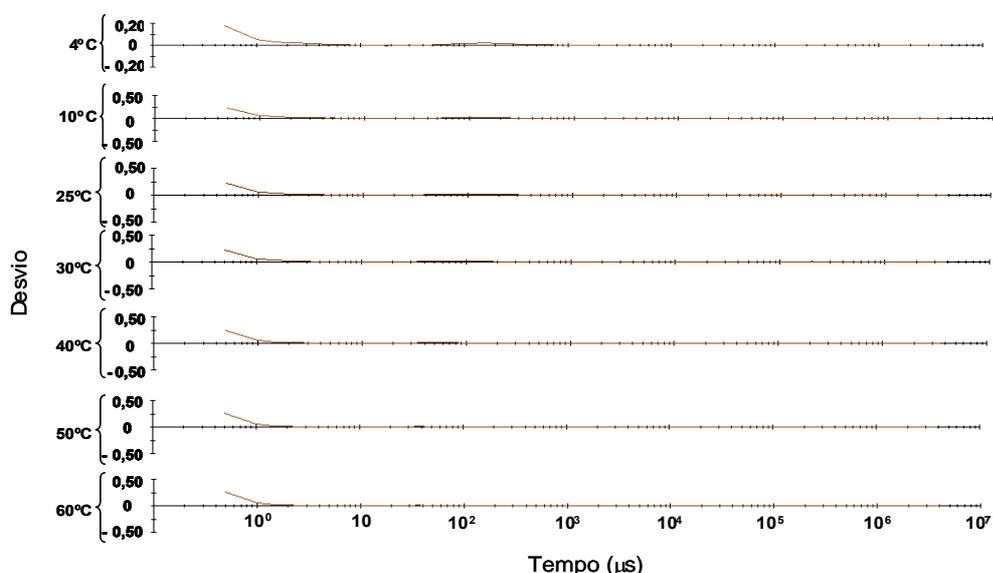


Figura 22. Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmico da solução de SPCI, variando temperatura.

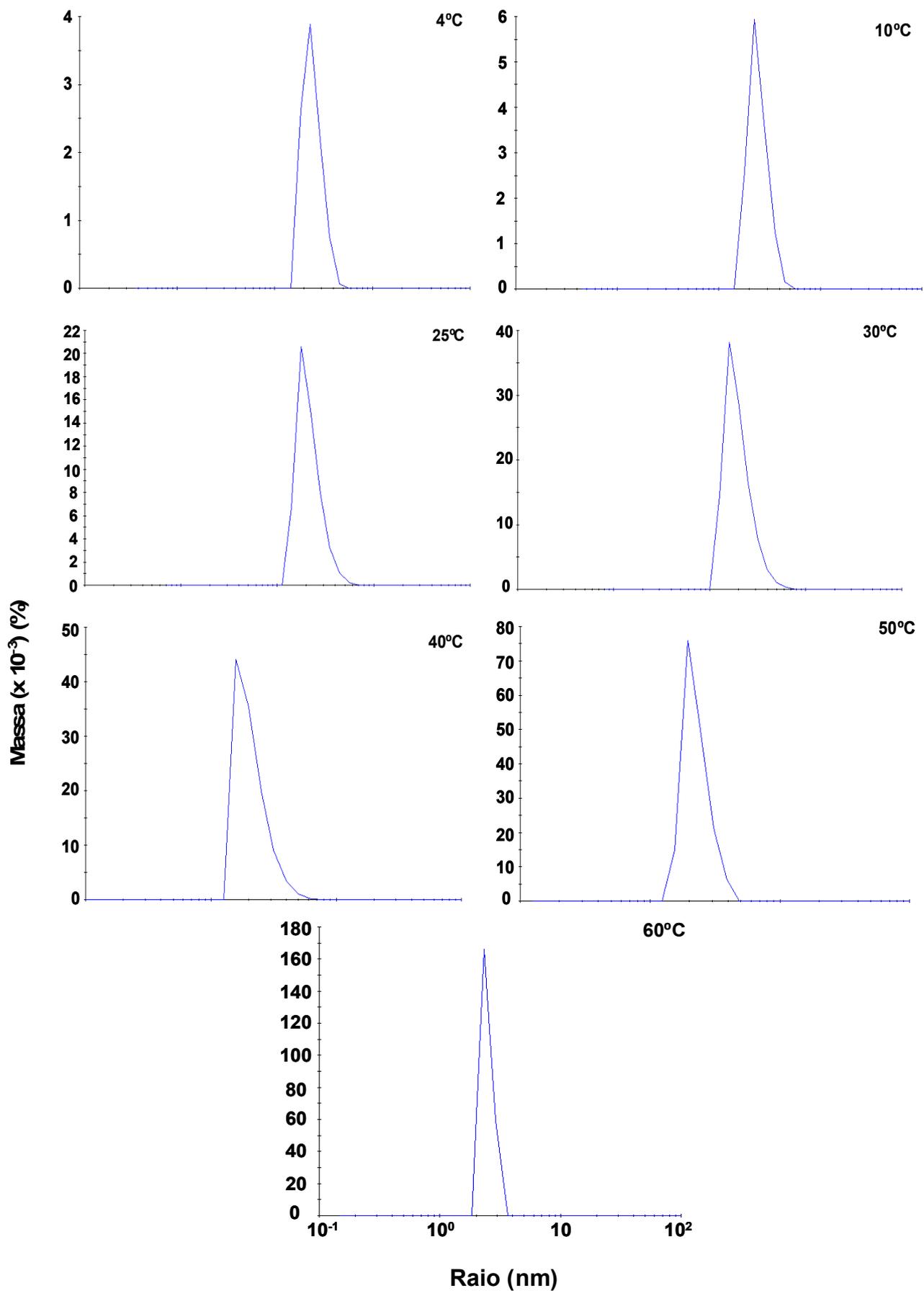


Figura 23. Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula variando a temperatura. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.

Tabela X. Análise dos dados de ELD ajustados (Borgstahl, 2007) do SPCI a 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com variação da temperatura.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Raio (nm)	Mm (kDa)	D ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Pd (%)	"Baseline"	SOS
4	2,43	27,08	$0,517 \times 10^{-6}$	22,67	1,000	63,136
10	2,46	27,69	$0,628 \times 10^{-6}$	22,29	1,000	70,295
25	2,16	20,44	$1,110 \times 10^{-6}$	30,63	1,000	80,321
30	2,01	17,33	$1,350 \times 10^{-6}$	35,36	1,000	69,496
40	2,12	19,61	$1,620 \times 10^{-6}$	31,36	1,000	52,694
50	2,28	23,22	$1,850 \times 10^{-6}$	23,39	1,000	49,343
60	2,47	28,03	$2,020 \times 10^{-6}$	10,64	1,001	48,966

Tabela XI. Dados de ELD da solução de SPCI a 50 μM em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl_2 50 mM com variação pH. O desvio padrão destes dados pode ser visto na figura 24.

pH	Medidas	Raio (nm)	Pd (%)	Mm (kDa)	Massa (%)
2	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9293
	2	2,11104	13,2054	19,3391	0,0707486
3	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9469
	2	1,91581	11,359	15,4108	0,0531315
	3	3894,03	0	$8,47219 \times 10^3$	$5,73753 \times 10^{-7}$
4	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9425
	2	2,14401	11,0577	20,0532	0,0575044
	3	61,5685	11,1241	51751,1	$5,23819 \times 10^{-7}$
5	1	0,0712157	0	0,00695721	99,91
	2	2,13325	15,6955	19,8186	0,0899699
	3	179,511	0	632848	$1,49216 \times 10^{-8}$
6	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9468
	2	1,87543	18,9868	14,6616	0,0532094
	3	25,3345	0	6480,1	$4,06224 \times 10^{-6}$
8	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9468
	2	1,87543	18,9868	14,6616	0,0532094
	3	2,10324	9,60253	19,1723	0,0399101
	4	48,5211	13,4218	29642,9	$1,79321 \times 10^{-6}$
	5	3894,03	0	$8,47219 \times 10^3$	$2,49028 \times 10^{-6}$
10	1	0,0712157	0	0,00695721	99,9332
	2	2,01727	13,534	17,3887	0,0667899
	3	58,6354	0	46165,6	$1,49298 \times 10^{-6}$
	4	3894,03	0	$8,47219 \times 10^3$	0,00485514

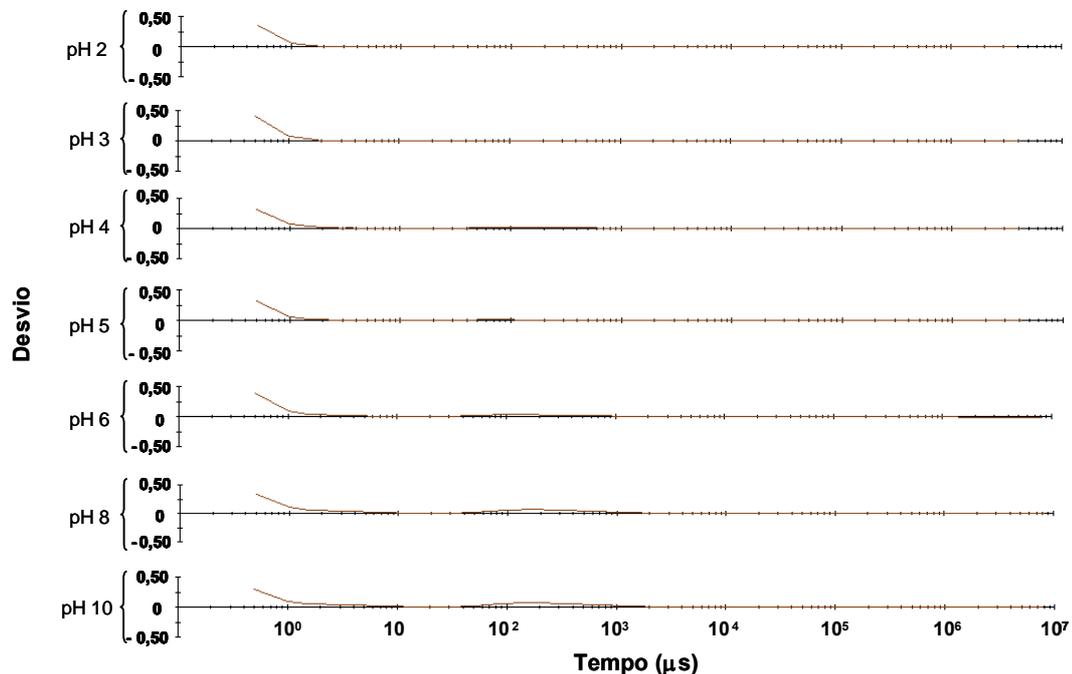


Figura 24. Desvio padrão do espalhamento de luz dinâmica da solução de SPCI, variando pH.

A solução de SPCI com valores de pH abaixo de 5 é monodispersa e monomodal, indicando alta possibilidade de cristalização, em pH 5 é moderadamente polidispersa (tabela XII). Em pH 6 a solução do inibidor apresenta uma distribuição multimodal (“Baseline” = 1,017) e é polidispersa (tabela XI). No pH 8 e 10 a solução se comporta como bimodal, apresentando um espalhamento de luz do tipo monodispersa (figura 25).

Tabela XII. Análise dos dados de ELD ajustados (Borgstahl, 2007) do SPCI variando o pH, a 25°C.

pH	Raio (nm)	Mm (kDa)	D (cm ² .s ⁻¹)	Pd (%)	“Baseline”	SOS
2	2,1	19,33	0,338 x 10 ⁻⁶	13,20	1,000	80,766
3	1,9	15,41	1,250 x 10 ⁻⁶	11,35	1,000	115,075
4	2,1	20,05	0,039 x 10 ⁻⁶	11,05	1,001	123,048
5	2,1	19,81	1,120 x 10 ⁻⁶	15,69	1,001	76,341
6	1,8	14,66	1,284 x 10 ⁻⁶	18,98	1,017	185,894
8	2,1	19,17	1,145 x 10 ⁻⁶	9,60	1,004	569,557
10	2,0	17,38	1,194 x 10 ⁻⁶	13,53	1,004	598,384

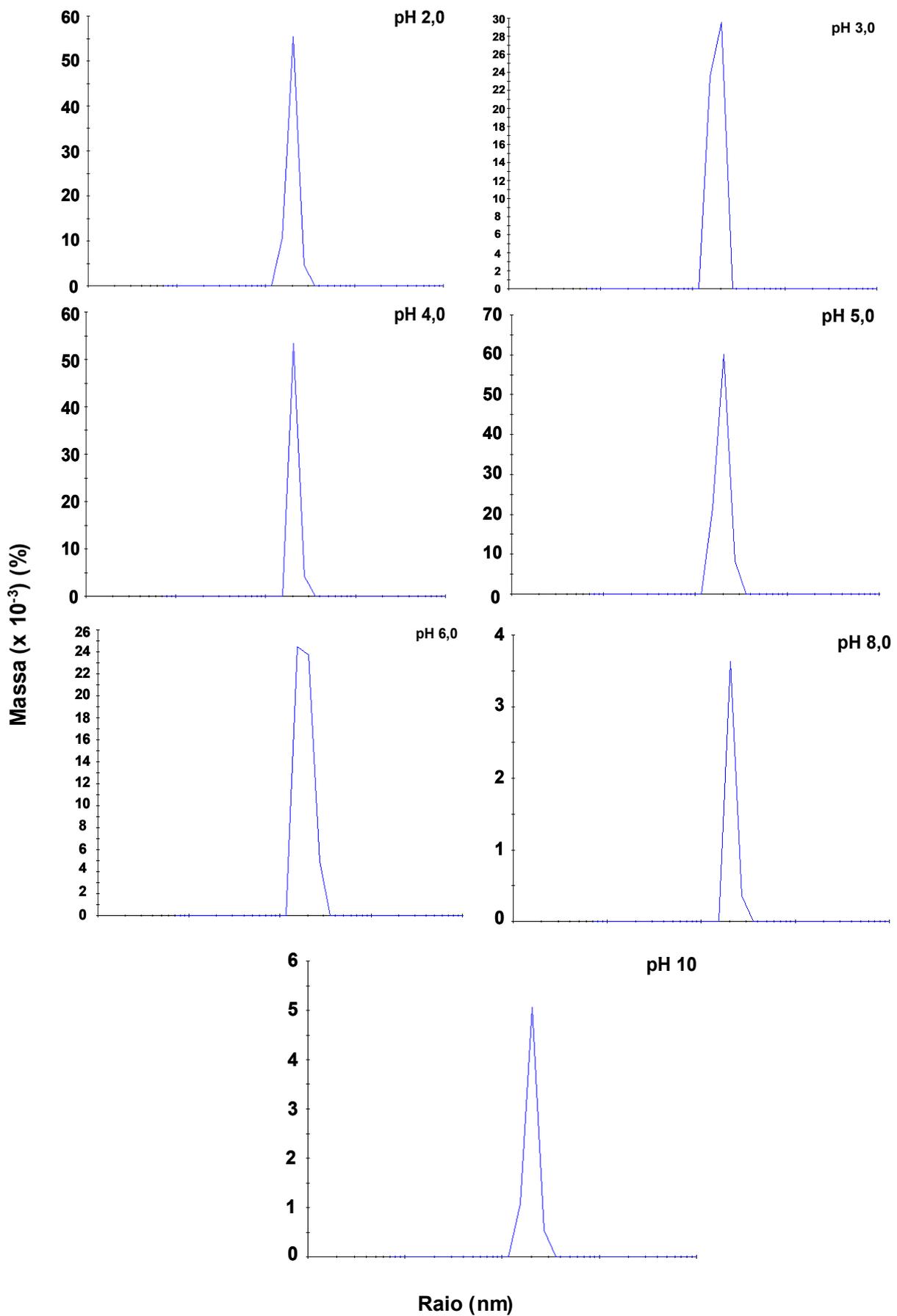


Figura 25. Distribuição percentual da massa do inibidor em função do tamanho da molécula variando o pH. O modelo estabelecido para o cálculo da distribuição do tamanho do inibidor foi a forma esférica.

5.5. Cristalização do complexo binário e coleta de dados

Os cristais foram formados nas várias condições iniciais de cristalização em um sistema automatizado do LNLS (figura 26). Os cristais obtidos nessa etapa inicial de cristalização difrataram a 4,0 Å (figura 27).

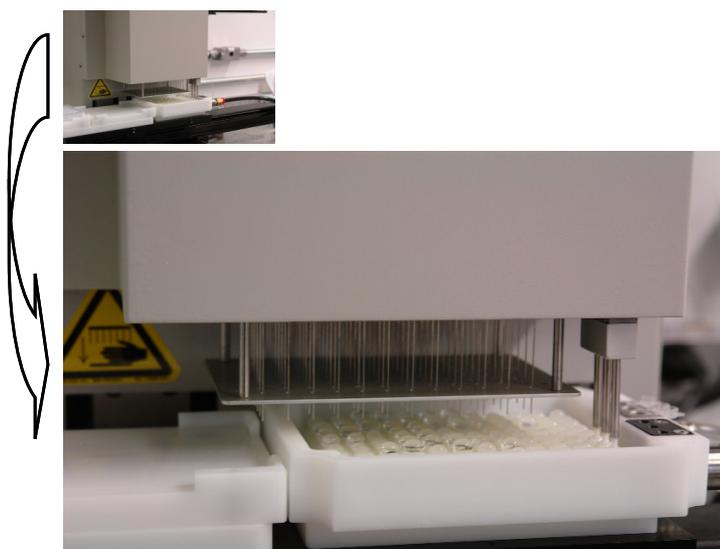


Figura 26. Sistema automatizado do LNLS utilizado para a realização da etapa inicial de cristalização.

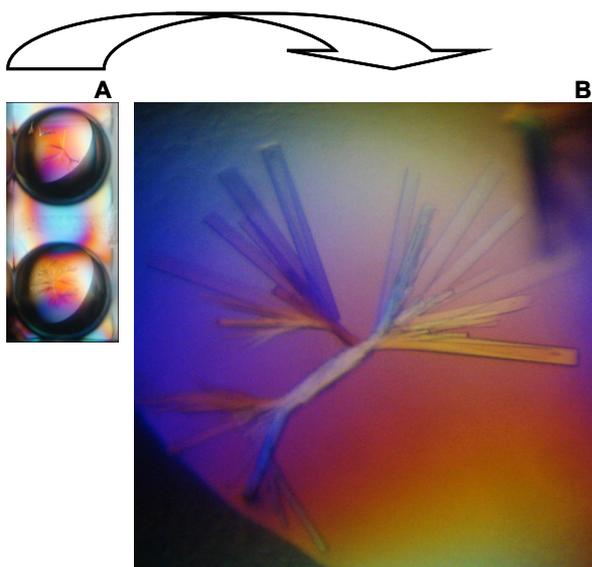


Figura 27. Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina obtidos na etapa inicial de cristalização utilizando o robô do LNLS. **A**, Cristais nos poços das placas de cristalização feitas pelo robô. **B**, Aumento da imagem do primeiro cristal (**A**, superior). Os cristais difrataram a 4,0 Å.

O primeiro refinamento dessa etapa inicial foi realizado pelo robô. Dentre as condições, a A1 (NaCl-HCl 100 mM pH 4,6 contendo PEG 6000 18% e ZnCl₂ 10 mM) e A2 (NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6 10 mM contendo PEG 6000 20% e ZnCl₂ 10 M) foram as que resultaram em cristais (figura 28) que melhor difrataram, sendo que os cristais da condição A2 difrataram melhor (3,8 Å).

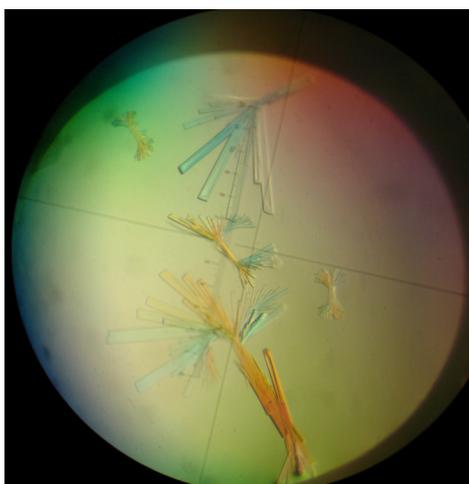


Figura 28. Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina obtidos na condição A2 (NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6 10 mM contendo PEG 6000 20% e ZnCl₂ 10 M) pelo sistema robotizado do LNLS. Esses cristais difrataram a 3,8 Å.

Tabela XIII. Condições que apresentaram cristais aparentemente adequados para submeter à difração por raios-X.

Condições		Tampão	Precipitante	Sal
Ref. 1	A1	NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6	PEG 6000 18%	ZnCl ₂ 10 mM
	A2	NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6	PEG 6000 20%	ZnCl ₂ 10 mM
	A3	NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6	PEG 6000 22%	ZnCl ₂ 10 mM
	A4	NaCl-HCl 0,1 M pH 4,6	PEG 6000 24%	ZnCl ₂ 10 mM
	A7	NaCl-HCl 0,1 M pH 5,0	PEG 6000 18%	ZnCl ₂ 10 mM
	A8	NaCl-HCl 0,1 M pH 5,0	PEG 6000 20%	ZnCl ₂ 10 mM
	A9	NaCl-HCl 0,1 M pH 5,0	PEG 6000 22%	ZnCl ₂ 10 mM
	B1	NaCl-HCl 0,1 M pH 5,4	PEG 6000 18%	ZnCl ₂ 10 mM
	C2	MES-NaOH 0,1 M pH 5,5	PEG 6000 20%	LiCl ₂ 200 mM
C3	MES-NaOH 0,1 M pH 5,5	PEG 6000 22%	LiCl ₂ 200 mM	
Ref. 2	E2	Formato de potássio-HCl 0,2 M pH 7,0	PEG 3350 20%	
	E3	Formato de potássio-HCl 0,2 M pH 7,0	PEG 3350 22%	
	F7	Formato de potássio-HCl 0,2 M pH 8,0	PEG 3350 18%	
	F9	Formato de potássio-HCl 0,2 M pH 8,0	PEG 3350 22%	
Ref. 3	C1	Bis-Tris 0,1 M pH 5,2	PEG 10000 15%	NH ₄ Ac 100mM
	C4	Bis-Tris 0,1 M pH 5,2	PEG 10000 21%	NH ₄ Ac 100mM

A partir dessa etapa inicial, foram feitas as primeiras placas de cristalização manuais. As condições observadas na tabela XIII são as que produziram cristais aparentemente adequados para serem submetidos à coleta de dados na linha de difração de raios-X.

Dessas condições, A1 a A4 foram as que produziram cristais que difrataram a 3,4 Å (figura 29).

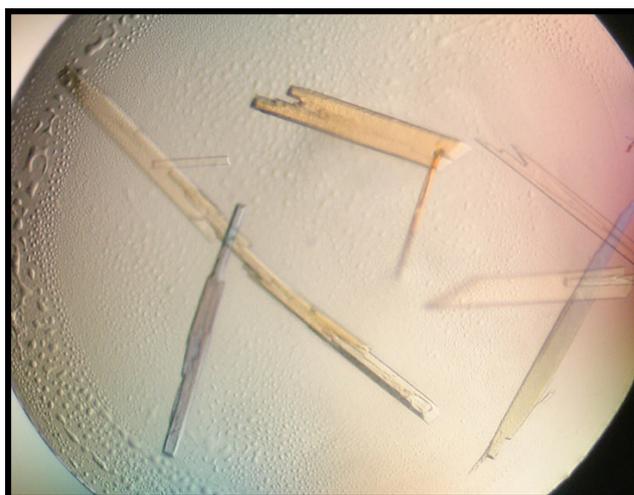


Figura 29. Cristais do complexo binário de SPCI obtidos em placas de cristalização manual nas condições A2 a A4. Estes cristais difrataram a 3,4 Å.

Dentre as condições mencionadas na tabela XIII, as condições A2, C1 e C2 foram selecionadas para adicionar os aditivos do kit Hampton Research (ver quadro I). As demais condições foram apenas repetidas.

O maior número e tamanho dos cristais foram obtidos apenas para a condição C1. A tabela XIV mostra os aditivos que resultaram em cristais na condição C1. Os aditivos 19 a 24 foram os que formaram cristais aparentemente melhores.

Na condição C2, apenas os aditivos 8 e 12 do screen-1 (HR2-420) e 7, 8, 21, 22 e 24 do screen-2 (HR2-430) apresentaram cristais. Já no caso da condição A2, os cristais apresentaram tamanhos menores: aditivos 11 e 13 do screen-1 (HR2-420) e 15 e 16 do screen-2 (HR2-430) (dados não mostrados).

A figura 30 mostra um cristal que cresceu em aditivo. Esse cristal difratou a 2,8 Å. Com essa resolução é possível para resolver e refinar a estrutura tridimensional do complexo binário.

Tabela XIV. Aditivos do kit Hampton Research que resultaram em cristais na condição C1.

Additive screen-1 (HR2-420)			Additive screen-2 (HR2-430)			Additive screen-3 (HR2-422)		
Nº	Conc	Aditivos	Nº	Conc	Aditivos	Nº	Conc	Aditivos
7	0,1M	Cloreto de manganês II tetrahidratado	2	0,1M	L-cisteína	7	2,0M	Tricianato de sódio
8	0,1M	Cloreto de estrôncio hexahidratado	3	0,1M	Sal EDTA sódio	8	30%w/v	Sal de sódio sulfato de Dextran (Mr 5.000)
15	50%w/v	Polietilenoglicol 400	4	0,1M	Nicotinamida adenina dinucleotídeo	15	40%v/v	1,3-Propanodiol
18	0,1M	Uréia	7	30%w/v	D(+)-Sucrose	18	40%v/v	1-Propanol
21	30%v/v	1,4-Dioxano	16	0,3M	Glicil-glicil-glicina	21	0,25%v/v	Diclorometano
22	30%v/v	Etanol	18	0,1M	Taurina	22	7%v/v	1-Butanol
23	30%v/v	2-Propanol	19	0,1M	Hidrocloreto de betaina	23	40%v/v	2,2,2-Trifluoroetanol
24	30%v/v	Metanol	20	5%w/v	Polivinilpirrolidona k15	24	0,1M	DTT
			24	30%v/v	Dimetil sulfoxido			

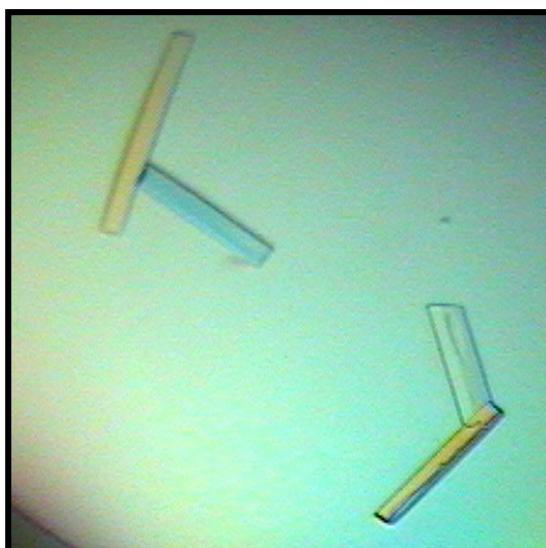


Figura 30. Cristais do complexo binário SPCI-quimotripsina crescidos na presença de aditivo. Esse cristal cresceu na condição MES-NaOH a 0,1 M pH 5.5 contendo PEG 6000 a 20% (w/v) e 0,2 M de LiCl_2 e o aditivo de sulfobetaina não detergente 201 a 2,0 M (NDSB-201) e difratou a 2,8 Å.

Além disso, foram obtidos cristais que também cresceram em outros aditivos (figura 31). Esses cristais ainda serão submetidos à difração para coleta de dados.

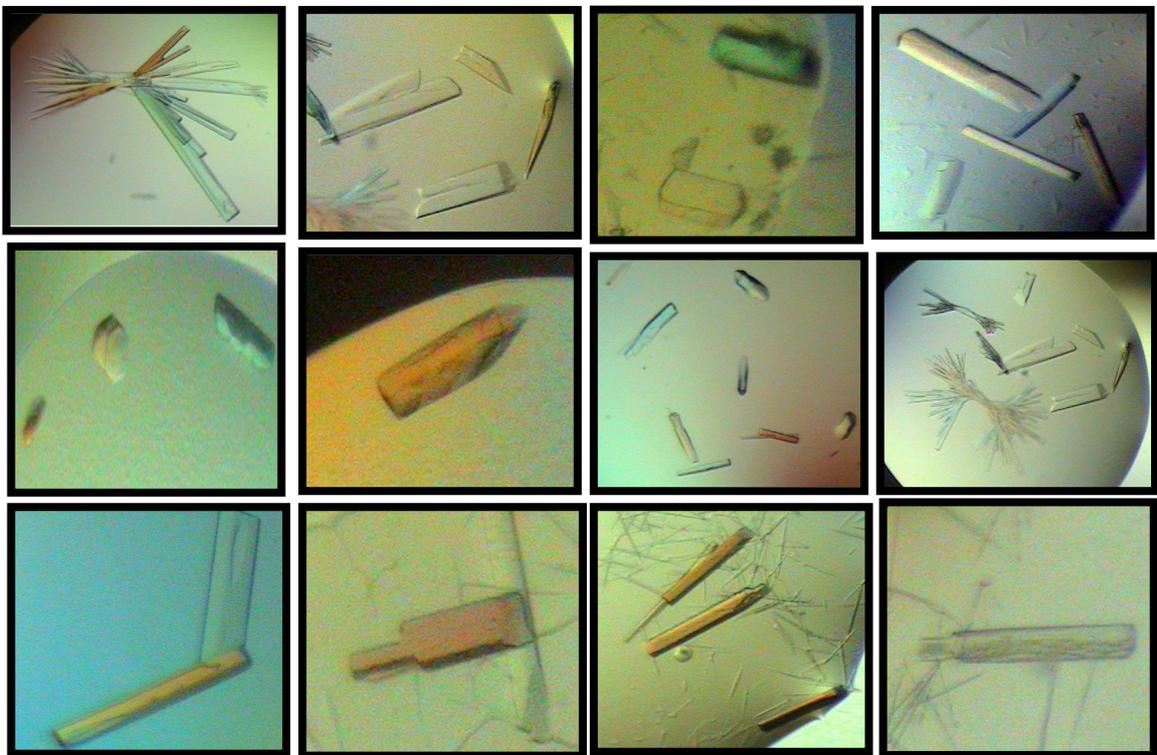


Figura 31. Cristais do complexo binário de SPCI-quimotripsina que cresceram em aditivos. Estes cristais serão submetidos à difração por raios-X para coleta de dados.

Nas condições sem aditivos que foram repetidas, houve crescimento de poucos cristais. Entre as que cresceram, os maiores foram das seguintes condições: A7, C4, E2 e F7 (dados não mostrados).

Novas condições foram estabelecidas para melhorar a qualidade do cristal e, conseqüentemente, da resolução. A proposta para tempo de linha e coleta de dados no LNLS já foi aprovada com dois turnos na linha MX2, agendada para os dias 8 e 9 de outubro de 2008.

6. DISCUSSÃO

6.1. Purificação do SPCI e do complexo binário

As diversas etapas da produção do extrato bruto protéico de sementes de *S. parahyba* (figura 4), obtido pelo método descrito por Souza (1992), foram monitoradas por SDS-PAGE 13% (figura 4). Duas bandas de aproximadamente 20 e 25 kDa estão presentes em praticamente todas as etapas do processo de produção do extrato bruto e, em particular, em maior proporção no plt-4 (figura 4B). Essa amostra, correspondente ao extrato bruto, foi utilizada nos ensaios de precipitação com TCA, visando à obtenção do SPCI purificado parcialmente (SPCI semi-purificado).

No protocolo desenvolvido por Teles *et al.* (2004), o plt-4 dialisado e liofilizado (extrato bruto), é dissolvido em água destilada. No entanto, nestas condições a solubilidade das proteínas contidas no extrato bruto não é total, resultando na perda de amostra na forma de precipitados insolúveis. Por essa razão, vários solventes foram testados e, a partir disso, ficou estabelecido que a diluição do extrato bruto deveria ser em tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,1, o mesmo utilizado para realizar a cromatografia de troca catiônica. Nessa nova condição foi obtida a melhor solubilidade do extrato bruto, sem a perda de proteínas na forma de precipitados, após a centrifugação.

A precipitação com TCA 1,2, 1,4 e 1,6% resultou em praticamente o mesmo conteúdo e tipos de proteínas, evidenciadas nas bandas do SDS-PAGE 13% (figura 5A). Nestas concentrações de TCA todas as proteínas de alta massa molecular foram precipitadas (figura 5B). Assim, foi estabelecida a concentração de 1,2% de TCA para a precipitação de proteínas do extrato bruto, visto que uma leve diminuição da intensidade da banda de 20 kDa (massa molecular do SPCI) passa a ocorrer a partir de 1,4%, indicando que a maior parte das proteínas na faixa de massa molecular semelhante a do SPCI são precipitadas a partir dessa concentração. As duas bandas de proteínas (20 KDa, SPCI; 25 kDa, contaminante) observadas na figura 5 (nas porcentagens mencionadas) devem apresentar solubilidades próximas entre si no tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,1, pois permanecem juntas em solução nas precipitações testadas.

A figura 6A mostra o perfil cromatográfico do SPCI em coluna de troca catiônica. A fração de maior absorbância dessa cromatografia foi analisada por SDS-PAGE 13% (figura 6B), que indicou o SPCI puro. Alíquotas dessa fração apresentaram atividade inibitória contra a α -quimotripsina (dados não mostrados).

Na purificação do complexo binário foram obtidas duas frações de absorbância (figura 7) que eluíram praticamente nas mesmas frações encontradas por Souza *et al.* (1995). A α -quimotripsina foi adicionada em excesso na mistura SPCI- α -quimotripsina, sendo provavelmente a molécula que predomina na segunda fração do cromatograma.

As amostras puras (SPCI e o complexo binário) foram utilizadas para a realização dos experimentos descritos nas metas deste trabalho. O complexo binário foi submetido ao processo de cristalização para posterior resolução de sua estrutura tridimensional e o SPCI foi utilizado para a análise das modificações conformacionais ou mudanças no ambiente molecular do triptofano quando em associação com a α -quimotripsina. Neste caso, foram utilizados os métodos de fluorescência estática e dinâmica, conforme discutido a seguir.

6.2. Modificações conformacionais do SPCI e α -quimotripsina na formação do complexo binário

6.2.1. Alterações no micro-ambiente dos triptofanos monitoradas por fluorescência estacionária

A interação do inibidor com a α -quimotripsina foi primeiramente analisada pelo método de fluorescência estacionária ou estática. A figura 8 mostra os espectros de fluorescência com redução gradativa na intensidade de emissão sem deslocamento de banda ($\lambda_{\text{máx}} = 332 \text{ nm}$), indicando que houve modificações na vizinhança do triptofano sem reposicionamento dos fluoróforos.

As atenuações na intensidade da fluorescência comumente são provocadas por efeitos do tipo colisional (atenuação dinâmica) e/ou estático que podem ocorrer entre o fluoróforo e o solvente ou com grupos moleculares na sua vizinhança. Quando ocorrem os dois tipos de atenuação o gráfico de Stern-Volmer, que relaciona as intensidades medidas na presença e ausência de um atenuador *versus*

variações na concentração do atenuador, apresenta uma curvatura voltada para o eixo da ordenada (Lakowicz, 2004). Esse perfil da curva indica que vários tipos de interações dos fluoróforos com o solvente ou entre as duas moléculas podem ocorrer durante a formação do complexo.

A diferenciação entre um e outro tipo de atenuação pode ser realizada por meio da variação da temperatura, da absorbância ou do tempo de vida de fluorescência. A medida do tempo de vida, dentre as variáveis citadas, é o melhor método para distinguir atenuação dinâmica da estática (Lakowicz, 2004). Neste trabalho foi utilizado medidas de emissão de fluorescência com a variação da temperatura e do tempo de vida para diferenciar tais tipos de atenuação durante a formação do complexo binário.

O aumento da temperatura provoca um aumento no coeficiente de difusão que, por sua vez, aumenta a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), caracterizando a atenuação colisional. No caso da atenuação estática, o aumento da temperatura reduz a estabilização do complexo formado, provocando a diminuição no valor de k_{sv} (Lakowicz, 2004). A figura 9 e a tabela I mostram que a atenuação da intensidade da fluorescência devido à interação do SPCI com a α -quimotripsina não ocorreu pela ação colisional nem estática, uma vez que não houve alteração nos valores de k_{sv} .

A seguir discutiremos quais as razões para as modificações no sinal de emissão fluorescente durante a formação do complexo binário a partir de dados da fluorescência dinâmica.

6.2.2. Ambientes moleculares de triptofanos pela análise do tempo de vida de fluorescência

As informações que são obtidas com medidas de fluorescência estacionária são importantes para caracterizar o ambiente de um fluoróforo. No entanto, é interessante examinar também dados obtidos com a fluorescência resolvida no tempo, que fornecem dados adicionais da dinâmica de grupos moleculares envolvidos com o ambiente do triptofano. Com esta técnica pode-se calcular o tempo de vida da fluorescência, isto é, o tempo em que os elétrons do fluoróforo permanecem no estado excitado e retornam ao estado fundamental. Com isto é

possível avaliar com mais detalhe, se uma amostra contém fluoróforos distintos e em ambientes enterrados ou expostos ao solvente (Nakaema e Sanches, 1998), ou se o ambiente do fluoróforo sofre mudanças conformacionais em decorrência da aproximação de grupos carregados ou por associação de moléculas na formação de complexos ou associação desses grupos com o próprio fluoróforo. Essas análises possibilitam fazer uma previsão da dinâmica das interações entre macromoléculas.

O objetivo das medidas resolvidas no tempo é determinar a forma de decaimento da intensidade do sinal fluorescente e interpretar o decaimento em termos das características físico-químicas da amostra e o seu ambiente molecular (Lakowicz, 2004). No caso de um único tipo de fluoróforo, os dados resolvidos no tempo podem indicar se este fluoróforo está presente em um ou mais ambientes distintos (já que o tempo de vida é sensível ao ambiente que circunda o fluoróforo), se o fluoróforo sofre reações quando no estado excitado (por exemplo, a transferência de energia) e dar informações sobre o tamanho, forma e mobilidade das moléculas (com medidas de anisotropia) (Nakaema e Sanches, 1998).

As medidas do tempo de vida do estado excitado de uma molécula (elétrons de seu fluoróforo) podem ser obtidas por duas técnicas, já mencionadas: uma no domínio do tempo e outra no domínio da frequência (Nakaema e Sanches, 1998).

No domínio do tempo a excitação é feita com pulsos de um laser e o ideal é que eles sejam bem mais curtos do que o tempo que se deseja medir. Ainda assim, é necessário fazer a deconvolução do sinal de excitação da fluorescência medida. Para se medir tempos menores que nanossegundos são usados lasers de picossegundos ou de femtossegundos (Nakaema e Sanches, 1998).

Com a técnica no domínio da frequência, utilizada neste trabalho, não é necessária a utilização de um laser. Medidas excelentes são obtidas com uma lâmpada de xenônio (Xe) que é de fácil manuseio e apresenta um amplo espectro de absorção em toda a região do ultravioleta-visível. Além disso, as medidas de tempos de vida bem curtos e com precisão podem ser realizadas com essa técnica utilizando a fonte descrita. Se houver necessidade de excitação mais intensa ou modulação mais alta, pode ser usado um laser ou radiação síncrotron (Nakaema e Sanches, 1998). Neste último, a radiação e o sinal são mais intensos, o que possibilita a utilização de amostras bem mais diluídas do que se utiliza na fonte de

radiação de xenônio. No caso específico deste trabalho, utilizamos a fonte de radiação síncrotron do LNLS, pelos motivos expostos.

A determinação do modelo que melhor descreve o decaimento da emissão de fluorescência para o SPCI e a α -quimotripsina, separadamente, bem como o número adequado de tempos de vida para essas moléculas foram realizados em primeiro lugar. O melhor modelo obtido foi aplicado para o estudo da interação entre as duas moléculas.

Os dados de espectroscopia de fluorescência dinâmica foram inicialmente analisados com um, dois e três decaimentos de emissão de fluorescência (tempo de vida) para os diferentes modelos. A análise para um único tempo de vida foi inadequada para descrever o decaimento de fluorescência do SPCI, resultando em um alto valor de χ^2 (figura 10 e tabela II). Dentre os modelos observados, *Discreto* e *Planck* foram os que apresentaram baixos valores de χ^2 , considerando o ajuste para dois tempos de vida. Os valores do tempo de vida (τ_1 e τ_2) e contribuição fracional da intensidade (f_1 e f_2) para estes dois modelos foram praticamente idênticos.

No caso da α -quimotripsina em todos os tempos de vida estudados, *Lorentz* e *Gaus* foram os que resultaram em valores baixos e regulares para χ^2 . Os modelos *Discreto* e *Planck* apresentaram um χ^2 menor ainda, porém apenas para ajustes de dois e três tempos de vida (figura 11 e tabela III).

Os ajustes para três tempos de vida forneceram um componente (τ_3) consideravelmente alto em relação ao tempo de vida do triptofano, tanto para o SPCI quanto para a α -quimotripsina (tabelas II e III). Esses valores apresentam uma contribuição fracional média de emissão de fluorescência extremamente baixa, da ordem de aproximadamente 10^{-7} . Ferreira *et al.* (1994), em seu estudo com a superóxido dismutase bovina, utilizando como sonda o fluoróforo tirosina, encontrou um componente (τ_3) muito curto com uma faixa de tempo de vida variando de 10 (limite mínimo estimado para resolução instrumental utilizado pelo autor) a 40 picosegundos, tendo uma variação na intensidade fracional de 1 a 3% da fluorescência total. Essa característica sugere que τ_3 é devido ao espalhamento de luz, e o melhoramento do χ^2 é possível devido à possibilidade de incluir essa pequena quantidade de luz parasítica (luz espalhada) no ajuste para três tempos de vida (tri-exponencial) (Ferreira *et al.*, 1994). No caso do inibidor e da α -

quimotripsina, no entanto, não há redução no valor de χ^2 quando se ajusta as curvas para três tempos de vida. Nesses casos, os valores de τ_3 são da ordem média de 10^5 e 10^2 ns, respectivamente, incompatíveis com os tempos de vida comumente encontrados para triptofanos enterrados ou expostos ao solvente.

Neste trabalho foi utilizado um filtro WG UV-320 para as medidas de fluorescência. Este filtro corta a luz espalhada para excitação abaixo de 320 nm, excluindo toda luz de origem diferente da fluorescência e que não foram consideradas nos nossos cálculos. No trabalho realizado por Ferreira *et al.* (1994) foi usado um filtro UV-320 para remover qualquer luz espalhada. Pelo exposto e considerando uma contribuição tão baixa de f , os valores do τ_3 encontradas para SPCI e α -quimotripsina são inadequados para descrever o decaimento para três tempos de vida. Isto mostra que o ajuste mais apropriado para a α -quimotripsina, assim como o SPCI, é aquele que considera dois tempos de vida e o modelo *Discreto* ou de *Planck*.

Os dados dos tempos de vida de fluorescência obtidos para as proteínas possibilitam uma análise, no nível atômico, do tipo de ambiente molecular ao qual pertencem os fluoróforos de uma macromolécula, especialmente os triptofanos, além de fornecer informações importantes sobre modificações desse ambiente devido às mudanças nas condições do meio provocadas por agentes externos ou por novas interações entre cadeias laterais adjacentes ao fluoróforo. Os resíduos de triptofanos enterrados e expostos ao solvente apresentam tempos de vida curto e longo, respectivamente (Lakowicz, 2004).

Privat *et al.* (1980) mostrou que a enzima 3-fosfoglicerato quinase (3-PGK) de levedura, contendo dois resíduos de triptofanos, apresenta três tempos de vida diferentes, em medidas dependentes do pH e do comprimento de onda. Um componente de 0,6 ns foi associado a um dos três resíduos de triptofano, enquanto os componentes de 3,1 e 7,0 ns foram associados ao segundo e terceiro resíduo de triptofano. Os decaimentos das intensidades dependentes do comprimento de onda foram usados para resolver as contribuições de cada resíduo para o espectro total de 3-PGK. Desse modo, os resíduos de tempos de vida mais curtos emitiram em 322 nm, enquanto que os resíduos com tempos de vida longos emitiram em 338 nm.

O tempo de vida mais longo para triptofano exposto ao solvente tem sido correlacionado com a emissão em maiores comprimentos de onda, correspondentes ao triptofano em ambientes mais polares (Grinvald e Steinberg, 1976). Sopkova *et al.* (1994), analisando o comportamento dinâmico da anexina V em função da ligação com o íon cálcio, mostrou que a adição de cálcio resulta no deslocamento da emissão máxima de 324 para 348 nm. Esse deslocamento para maior comprimento de onda dependente de cálcio é acompanhado por um aumento do tempo de vida.

Wasylewski *et al.* (1995), estudando uma proteína receptora de cAMP de *Escherichia coli* pela técnica no domínio da frequência para emissão intrínseca de triptofano, encontrou tempos de decaimento próximos de 1,5 e 6,8 ns. Tempos de decaimentos similares foram obtidos na ausência e presença de cAMP ligados. Em ensaios de atenuação de fluorescência associados às medidas de tempo de vida, indicaram que para a proteína não ligada ao cAMP, o menor tempo de decaimento não mudou com o aumento da concentração de iodeto (carregado negativamente), enquanto o tempo de vida longo diminuiu. Isso indica que o componente de 6,8 ns ($f = 0,75$) é devido à exposição do resíduo de triptofano e a diminuição do tempo de vida foi decorrente do efeito da atenuação da fluorescência pelo iodeto. O componente de 1,5 ns ($f = 0,25$), que não sofreu atenuação da fluorescência pelo iodeto, é atribuído ao resíduo de triptofano enterrado. No entanto, na presença de cAMP ligado, ambos os tempos de vida diminuem na presença do iodeto, indicando que ambos sofrem atenuação decorrente de mudanças conformacionais no ambiente do fluoróforo.

A enzima álcool desidrogenase do fígado eqüino com dois triptofanos foi analisada por fluorescência resolvida no tempo (Ross *et al.*, 1981). Conforme o autor, essa enzima apresenta um decaimento bi-exponencial (3,8 e 7,2 ns), atribuindo o componente 7,2 ns ao Trp-15 (exposto) e o 3,8 ns ao Trp-314 (enterrado). Nesse trabalho o espectro de fluorescência resolvido no tempo mostrou que o Trp-15 e Trp-314 estão associados às bandas de emissão em 340 e 320 nm, respectivamente.

O estudo da fluorescência no domínio da frequência da metaloproteinase do *Staphylococcus aureus*, que liga a cálcio, apresenta dois triptofanos os quais exibem um decaimento bi-exponencial. A 10°C em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 9,0

contendo CaCl_2 10 mM encontraram tempos de vida de 1,2 e 5,1 nanosegundos. O resíduo de triptofano de tempo de vida curto tem um máximo de emissão de fluorescência a 317 nm e o segundo a 350 nm. Quando a metaloproteinase liga-se ao cálcio, o triptofano caracterizado pelo tempo de vida curto é completamente enterrado, já o segundo resíduo é exposto (Wasylewski e Eftink, 1987).

Shashidhara e Gaikwad (2007), estudando a α -manosidase por fluorescência resolvida no tempo e atenuação da intensidade de fluorescência, obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho: $\tau_1 = 1,51$ ns e $f_1 = 0,37$, $\tau_2 = 5,99$ ns e $f_2 = 0,63$, reforçando a relação do tempo de vida de fluorescência com os ambientes dos fluoróforos, sendo aqueles mais longos, correspondentes ao ambiente polar do fluoróforo, estão diretamente relacionado com a emissão em maiores comprimentos de onda.

Os valores dos tempos de vida encontrados para α -quimotripsina (tabela III, ajustes para dois tempos de vida) indicaram a presença de duas populações distintas de triptofanos nessa molécula, contribuindo diferentemente na emissão fluorescente: uma em ambiente hidrofóbico ($\tau_1 = 0,88$ ns) e outra em ambiente hidrofílico ($\tau_2 = 4,16$ ns). A primeira população de triptofanos tem menor contribuição da intensidade fracional ($f_1 = 0,37$) da emissão de fluorescência em relação à segunda ($f_2 = 0,63$).

6.2.3. Análise do decaimento bi-exponencial da fluorescência do SPCI

As amostras com muitos fluoróforos apresentam, tipicamente, decaimentos do tipo “multi-exponenciais”. No entanto, mesmo aquelas com um único triptofano podem apresentar decaimentos de fluorescência complexas devido à heterogeneidade conformacional das formas moleculares no estado excitado (Lakowicz, 2004).

A natureza dinâmica e o grau de liberdade dos átomos dispostos de forma organizada nas proteínas, estudada por fluorescência dinâmica, tem mostrado a que essa heterogeneidade molecular é devido a existência de uma hierarquia de subestados conformacionais (Frauenfelder e Gratton, 1986). O decaimento bi-exponencial atribuído ao SPCI, representado pelos dois tempos de vida

encontrados (tabela II), não podem ser atribuídos a populações distintas de triptofano, uma vez que esta proteína possui somente um único triptofano (Souza *et al.*, 1992), mas sim as conformações dinâmicas desse fluoróforo que ocorrem durante o estado excitado.

A explicação para o decaimento bi-exponencial do SPCI está provavelmente relacionada a essa capacidade de apresentar subestados conformacionais no estado excitado. A 25°C e em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo CaCl₂ 50 mM, o SPCI apresentou dois tempos de vida, caracterizando, portanto, a existência de subestados conformacionais dinâmicos na sua estrutura.

O decaimento de fluorescência do triptofano em proteínas é complexo, podendo ser descrito ou caracterizado por vários componentes exponenciais (tempos de vida), mesmo para proteínas contendo um único resíduo de Trp (Beechem e Brand, 1985), como é o caso do SPCI. O decaimento de fluorescência decorrente da presença de subestados conformacionais (expressado como a largura das bandas das curvas de distribuição do tempo de vida), está relacionado à micro-heterogeneidade dos ambientes do Trp e a dinâmica conformacional das proteínas, ou seja, seu movimento atômico (Ferreira *et al.*, 1994). Essa característica estrutural pode ser atribuída a vários fatores, incluindo o efeito da temperatura, do pH, da força iônica e da viscosidade do solvente, dentre outras.

O efeito da viscosidade do solvente sobre a dinâmica da proteína está relacionado com alteração das interconversões entre esses subestados (Beece *et al.*, 1980). Este modelo reforça que movimentos estruturais na proteína e condições impostas pelo solvente estão intimamente relacionados, sendo a taxa de interconversão entre os subestados inversamente proporcional à viscosidade (Ferreira *et al.*, 1994). Estes últimos autores interpretam a dinâmica conformacional de uma proteína pela largura da distribuição do tempo de vida, correlacionando a ampla largura da distribuição do tempo de vida com a alta viscosidade do solvente.

Além da viscosidade, a temperatura também influi nos graus de liberdade dos átomos que compõe as macromoléculas e na dinâmica conformacional de proteínas, sendo seu efeito analisado pela largura da banda de distribuição (gaussiana ou laurensiana, por exemplo) do tempo de vida. O aumento da temperatura resulta no aumento da taxa de interconversão entre os subestados conformacionais nas proteínas. Isto, por sua vez, leva a um aumento dos diferentes

ambientes visitados pelo fluoróforo durante o estado excitado e, conseqüentemente, a uma estreita largura na distribuição do tempo de vida (menor heterogeneidade conformacional) (Ferreira *et al.*, 1994). Em temperaturas baixas, por outro lado, as taxas de interconversão diminuem e a proteína apresenta vários subestados, resultando em uma distribuição de tempo de vida muito mais ampla (Ferreira *et al.*, 1994).

Dentre as várias razões para uma distribuição complexa do decaimento de fluorescência, o decaimento bi-exponencial do SPCI poderia ser explicado por outras causas, como a transferência de energia entre os fluoróforos (Lakowicz, 2004). No entanto, essa transferência de energia não ocorre para o SPCI, visto que esse inibidor apresenta um único triptofano em sua estrutura.

O efeito do filtro interno (do inglês “inner-filter effect”) poderia ser também considerado como um dos fatores que interfere no estado excitado dos fluoróforos. No entanto, esse fenômeno não está relacionado diretamente com decaimento de fluorescência. O efeito do filtro interno é uma atenuação da intensidade de fluorescência devido à absorção da energia de emissão de um fluoróforo no seu comprimento de onda de excitação (Subbarao e MacDonald, 1993). O tempo de vida, nesse caso, não depende da concentração do fluoróforo, exceto se houver supressão entre ambas as moléculas em solução, e também não causa nenhuma alteração no tempo de vida do fluoróforo. É um fenômeno causado por altas concentrações da proteína e deve ser considerado somente para as medidas de fluorescência estacionária, não para fluorescência dinâmica.

Outro fator que poderia estar relacionado com a existência de dois tempos de vida seria a formação de dímeros ou oligômeros entre as moléculas de SPCI. Nesse caso, o SPCI na forma dimérica poderia apresentar duas populações de triptofano posicionados diferentemente no oligômero, o que poderia explicar os valores dos dois tempos de vida obtidos nos ajustes apresentados nos resultados. A análise topográfica do SPCI, utilizando Microscopia de Força Atômica (MFA), mostrou que o SPCI tende a formar oligômeros em diferentes formas, predominando a hexagonal (Leite *et al.*, 2002). Esses resultados, no entanto, foram obtidos para o SPCI na forma de cristais amorfos, condição necessária para a análise das imagens de MFA, diferente da fluorescência dinâmica que requer a amostra em solução. Por essa razão, a tendência à formação de oligômeros do SPCI em solução foi estudada por

espalhamento de luz dinâmica (ELD), uma técnica espectroscópica de maior precisão para esse tipo de análise. Nessa técnica as amostras são analisadas em solução e resultam em dados hidrodinâmicos importantes para os seguintes estudos: oligomerização; cristalização de proteínas a partir da análise da polidispersividade, que é uma das formas de avaliar a tendência de formação de estruturas oligoméricas de proteínas, dificultando o processo de cristalização das mesmas; estimativa da massa molecular e do raio de giro das proteínas que está diretamente relacionado com o volume da molécula em solução. Os dados obtidos para o SPCI com essa técnica estão discutidos a seguir.

6.2.4. Análise da tendência do SPCI à formação de oligômeros

Os experimentos de ELD mostraram que as variações da concentração, temperatura e pH das soluções de SPCI não foram suficientes para provocar a formação de oligômeros dessa molécula, indicado pelas curvas de distribuição do tipo monomodal (uma única forma molecular) da proteína, exceto para pH 6, 8 e 9 (tabela XII).

Em temperaturas relativamente altas (60°C, tabela X) e em pH 2, 3 e 4 (tabela XII) a solução de SPCI, além de apresentar uma distribuição do tipo monomodal, também apresentou monodispersividade, indicando maior homogeneidade das conformações do inibidor, compatíveis com o processo de cristalização dessa proteína.

Os dados de raio de giro, da massa molecular e do coeficiente de difusão do SPCI na estado monomérica encontrados por Souza (1992), por outras técnicas, são semelhantes aos obtidos por ELD. Estas informações são suficientes para afirmar que o SPCI em solução apresenta características hidrodinâmicas compatíveis com a forma predominantemente monomérica, que indica a possibilidade de cristalização dessa proteína para resolução da estrutura tridimensional por difração de raios-X.

Na maioria dos ajustes feitos dos ensaios de ELD resultaram em duas situações extremas. A primeira situação é que a massa molecular é extremamente alta (ordem de grandeza: 10^4 kDa, ou mais) com uma percentagem de massa da ordem de 10^{-7} , ou menos. Esses resultados são característicos da presença de um número

reduzido de partículas de alta massa molecular em solução (ver tabelas VII, IX e XI) (Borgstahl, 2007). A segunda situação é quando o valor do raio hidrodinâmico está abaixo de 0,5 nm com um percentual de massa próximo a 100%, situação encontrada neste trabalho (tabelas VII, IX e XI). Esse fenômeno tem sido relatado e nomeado como “pico do solvente”, mas na verdade ele ocorre devido ao ruído após o pulso no fotodiodo. Este ruído tende a aparecer quando a concentração da proteína é baixa. Assim, pode-se ignorar ou descartar essas medidas (Borgstahl, 2007).

A cristalização do SPCI (Teles *et al.*, 2007) foi realizada com sucesso e os dados cristalográficos coletados no LNLS e processados pela equipe de Biofísica Molecular da UnB mostraram a presença de dímeros do inibidor na unidade assimétrica do cristal (dados ainda em fase de refinamento). A resolução preliminar da estrutura tridimensional do inibidor (dados em análise e não mostrados) indica a presença de resíduos hidrofóbicos na região de interface entre os monômeros de SPCI que formam o dímero. Essa formação dimérica ocorreu em alta concentração do SPCI (20 mg.mL^{-1}) em tampão acetato de sódio 0,1 M trihidratado pH 4,6 contendo PEG 20000 33% (v/v) e sulfato de amônio 0,2 M, condição próxima ao valor do pI do SPCI e que, juntamente com a concentração elevada do inibidor, justifica essa dimerização. Experimentos de ELD nas mesmas condições realizados por Teles *et al.* (2007) não podem ser repetidos para o SPCI uma vez que a concentração da solução é muito elevada e a sensibilidade do equipamento indicaria a relação sinal/ruído muito alta.

Os menores valores do coeficiente de difusão ocorreram exatamente no pH 4 (tabela XII). Esses valores advêm da proximidade ao pI (4,2) do SPCI, considerando que nesse pH as proteínas reduzem a sua solubilidade, diminuindo, conseqüentemente, o coeficiente de difusão. Mesmo nesse pH, onde há a tendência da formação de agregados, a sensibilidade da técnica de ELD possibilitou demonstrar a inexistência de oligômeros.

Os valores das linhas de base para os pH 6, 7 e 8 indicaram uma distribuição multimodal e bimodal na solução (tabela XII) e precisam ser melhor analisados. Considerando que nesses pHs foram obtidos os maiores valores de “SOS” de todos os ensaios realizados, é provável que tais valores tenham interferido na linha de

base, apresentando valores qualitativos contrastante com os dados de raio, massa molecular e coeficiente de difusão obtidos para a forma monomérica do SPCI.

Portanto, os resultados dos experimentos de ELD, variando a concentração, pH e temperatura da proteína indicam que o SPCI é uma molécula predominantemente monomérica em solução. Esses dados corroboram a explicação dada para a fluorescência dinâmica do SPCI, onde os ajustes das curvas para dois tempos de vida decorreram da presença de unidades de triptofano, no monômero do SPCI, em duas conformações dinâmicas diferentes quando estão no estado excitado e não pela presença de mais de um triptofano associado com moléculas do SPCI em arranjo dimérico.

6.2.5. Interação do SPCI com a α -quimotripsina, com as ligações dissulfeto do inibidor preservadas.

A redução do tempo de vida dos triptofanos observada por fluorescência dinâmica durante a interação do SPCI com a α -quimotripsina (figura 14) foi caracterizada por um valor da constante de atenuação dinâmica da ordem de grandeza de 10^3 ($K_D = 1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Shaikh *et al.* (2006) encontrou um valor da mesma ordem de grandeza ($K_D = 4,53 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) para a interação da droga nimesulida (NIM) com a albumina do soro bovino (BSA).

O tempo de vida de BSA na ausência da droga ($\tau_0 = 4,65 \text{ ns}$, selecionado com base no valor de maior amplitude) foi utilizado pelos autores para o cálculo da constante de atenuação bimolecular ($k_q = 1,95 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Shaikh *et al.*, 2006). Esta constante reflete a eficiência da atenuação ou a acessibilidade dos fluoróforos ao atenuador (Lakowicz, 2004). A magnitude de k_q comparada com a constante correspondente à taxa bimolecular de difusão controlada ($k_0 = 1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) da molécula indicam que a atenuação não ocorre de forma dinâmica ou estática, mas pela formação de complexos moleculares (Shaikh *et al.*, 2006). A constante k_0 está relacionada com o fluxo de difusão de uma molécula com um coeficiente de difusão D através de uma superfície de esfera de raio R (Lakowicz, 2004). Essa constante pode ser calculada usando a equação de Smoluchowski (veja Anexo I).

A ordem de grandeza de k_q encontrada na interação do SPCI com α -quimotripsina ($k_q = 1,63 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) foi similar àquela obtida para a interação de

NIM com BSA. A atenuação por difusão controlada tipicamente resulta em valores de k_q próximos de $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Lakowicz, 2004). Valores menores podem estar relacionados com a proteção estérica do fluoróforo e valores aparentemente maiores freqüentemente indicam algum tipo de ligação na interface de interação entre duas moléculas. Portanto, considerando o valor obtido de k_q , a atenuação do tempo de vida resultante da interação do SPCI com a α -quimotripsina é devido à formação do complexo. Isto corrobora os dados obtidos neste trabalho pelo método de fluorescência estacionária, onde não houve alteração nos valores de k_{sv} em várias temperaturas (tabela I).

A atenuação do tempo de vida pela formação do complexo acontece quando a enzima atinge uma concentração de $20 \mu\text{M}$ (figura 14). O SPCI apresenta uma alta afinidade pela enzima ($K_i = 9,0 \times 10^{-8}\text{M}$) (Teles *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 1995). Considerando essas características qual seria a possível causa de não ocorrer uma atenuação no tempo de vida em concentrações inferiores a $20 \mu\text{M}$?

As medidas do tempo de vida longo (deslocamento de comprimento de onda para a faixa vermelha do espectro) e curto (deslocamento para a faixa azul do espectro) caracterizam fluoróforos em ambientes hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente (Lakowicz, 2004; Wasylewski *et al.*, 1995; Privat *et al.*, 1980; Brochon *et al.*, 1977; Ross *et al.*, 1981). A interação entre SPCI e α -quimotripsina (figura 14) em concentrações da enzima inferiores a $20 \mu\text{M}$ promoveu um micro-ambiente hidrofílico ao redor dos triptofanos das duas moléculas. Esse aumento da força hidrofílica resulta, provavelmente, de uma mudança conformacional suficiente para permitir o acesso do solvente aos triptofanos.

Em concentrações superiores a $20 \mu\text{M}$ ocorre o efeito contrário. O acesso do solvente aos triptofanos é dificultado, reduzindo o tempo de vida e, conseqüentemente, aumentando a atenuação do tempo de vida de fluorescência registrada pelo gráfico de Stern-Volmer. Isto porque os espectros de fluorescência (figura 8) mostraram que não há deslocamento de triptofano (sem deslocamento da banda de emissão, $\lambda_{\text{máx}} = 332 \text{ nm}$) para o solvente na associação das moléculas.

Os resultados experimentais (concentração, temperatura e pH) de ELD mostraram que o SPCI não forma oligômeros, portanto a oligomerização pelo SPCI

não é o desencadeador da mudança conformacional ocorrida na parte ascendente do gráfico (concentrações superiores a 20 μM da enzima) (figura 14).

A α -quimotripsina tem sido reconhecida como uma proteína com tendência a oligomerização e esse processo pode estar relacionado com a determinação da afinidade e especificidade de inibidores (Filfil e Chalikian, 2003). Barbosa *et al.* (2007), utilizando Microscopia de Força Atômica, mostraram que a α -quimotripsina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresenta diferentes formas oligoméricas: monômero (52%), dímero (24%), trímero (17%) e tetrâmero (4%). Concentrações superiores a 20 μM dessa enzima podem ter favorecido a formação de oligômeros mais complexos (tetrâmero) (Barbosa *et al.*, 2007), reduzindo o tempo de vida por situar os triptofanos em ambiente hidrofóbico entre as interfaces oligomerizadas.

A explicação para a atenuação do tempo de vida ou da intensidade de fluorescência durante a formação do complexo pode ser por transferência de prótons intramolecular de grupos protonados para o anel indol do triptofano. A forma protonada do fluoróforo excitado reduz a fluorescência (Weber, 1961; Bridges e Williams, 1968; Lehrer, 1970). Esta explicação não pode ser considerada neste caso, já que não houve variação de pH necessária para ionização e protonação de resíduos. Portanto, considerando o valor obtido de k_q , os valores semelhantes de k_{sv} (tabela I) obtidos por fluorescência estacionária em várias temperaturas e as razões acima descritas, a atenuação do tempo de vida acima 20 μM da α -quimotripsina é devido provavelmente à oligomerização da enzima.

6.2.6. Interação do SPCI nativo com a α -quimotripsina em solvente salino

As mudanças conformacionais nos micro-ambientes dos triptofanos durante a formação do complexo foi analisada com o SPCI a 100 μM em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl_2 50 mM pH 7,6, na presença de NaCl 0,2 M. Os modelos que melhor descreveram o decaimento de fluorescência para ambas as moléculas separadamente e em interação (cada fração da titulação) (dados não mostrados) foram o *Discreto* e *Planck* (ajuste para dois tempos de vida), os mesmos obtidos em experimentos anteriores.

Os valores dos tempos de vida do SPCl na ausência da enzima {SPCl_[sem sal]: $\tau_1 = 0,67$ ($f_1 = 0,52$) e $\tau_2 = 4,98$ ns ($f_2 = 0,45$); SPCl_[sal]: $\tau_1 = 0,43$ ($f_1 = 0,43$) e $\tau_2 = 4,70$ ns ($f_2 = 0,48$)} sugerem que o NaCl a 0,2 M não alterou o número de subestados conformacionais da molécula, o que pode ser observado pela conservação do decaimento bi-exponencial (dois tempos de vida) para ambas as condições analisadas. No entanto, o ambiente salino reduziu ambos os tempos de vida (τ_1 e τ_2). Essa redução é, provavelmente, conseqüência da redução da força interativa do triptofano com os resíduos circunvizinhos pela ação salina, ou efeito de “blindagem” de cargas de cadeias laterais de outros resíduos carregados e posicionados nas proximidades do ambiente do triptofano.

Os valores obtidos para os tempo de vida da enzima na ausência e presença de sal { α -quimotripsina_[sem sal]: $\tau_1 = 0,91$ ($f_1 = 0,37$) e $\tau_2 = 4,15$ ns ($f_2 = 0,63$); α -quimotripsina_[sal]: $\tau_1 = 0,83$ ($f_1 = 0,32$) e $\tau_2 = 3,84$ ns ($f_2 = 0,66$)}, mostram que a distribuição dos triptofanos permanece constante, porém com redução no tempo de vida de ambas as populações de triptofano, devido, possivelmente, à diminuição na interação dos triptofanos com os aminoácidos que o cercam, provavelmente pela mesma razão exposta acima.

A interação do SPCl com a α -quimotripsina na presença de NaCl 0,2 M não resultou na redução do tempo de vida na faixa de concentração da enzima acima de 32 μ M, representada pela segunda região do gráfico apresentado na figura 15, como observado no experimento na ausência de sal (figura 14). Uma flutuação nos dados apresentados no gráfico é observada quando a α -quimotripsina atinge 32 μ M. A interferência do sal no processo de oligomerização da enzima provavelmente justifica essa flutuação. No entanto, dados adicionais de ELD ou ultracentrifugação analítica precisam ser obtidos para comprovar essa interferência do sal na oligomerização da enzima. Adicionalmente, no intervalo de 20 a 32 μ M a k_q manteve-se acima de $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($k_q = 1,1 \times 10^{13}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), indicando que a atenuação do tempo de vida é por ligação molecular (formação de complexo) e não pelo efeito colisional ou estático, corroborando os resultados obtidos com os ensaios de fluorescência estacionária.

A redução do tempo de vida do complexo passa a ocorrer na mesma concentração da α -quimotripsina (20 μ M) encontrada no experimento discutido no

item 6.2.5, provavelmente devido à baixa concentração do sal. Os valores de K_{sv} e K_q para ambos os experimentos, ausência e presença de NaCl 0,2 M, aumentaram aproximadamente 5 e 10 vezes, respectivamente. Esse aumento é devido, provavelmente, à concentração do SPCI (100 μ M) utilizado para o experimento. Essa concentração foi mantida para o próximo experimento, visto que apresentou melhor sinal no fluorímetro e considerando que a concentração de proteínas não interfere no tempo de vida dos fluoróforos.

6.2.7. Interação do SPCI com a α -quimotripsina, com as ligações dissulfeto do inibidor reduzidas.

O papel das ligações dissulfeto na estabilidade estrutural do SPCI e sua relação nas mudanças conformacionais decorrentes das interações com a α -quimotripsina foram realizadas reduzindo as ligações dissulfeto. Essas ligações são de importância secundária na manutenção da alta estabilidade térmica de SPCI, uma vez que o rompimento das mesmas não influencia na atividade inibitória dessa molécula contra a α -quimotripsina (Souza *et al.*, 2000).

O ajuste que melhor descreveu o decaimento de fluorescência do SPCI com as ligações dissulfeto reduzidas foram os modelos *Discreto* e *Planck* para dois tempos de vida: $\tau_1 = 0,59$ ($f_1 = 0,55$) e $\tau_2 = 5,42$ ns ($f_2 = 0,435$), estes valores foram maiores do que aquelas em condições não redutoras.

A estrutura geral dos inibidores da família Kunitz, representada pelo Inibidor de Tripsina de *Erythrina variegata* (ETI), é praticamente toda β , consistindo de 12 fitas β -antiparalelas ligadas por longas alças. Seis das 12 fitas formam um barril- β antiparalelo curto. As interações entre as seis fitas são em grande número o que confere a estabilidade dessa molécula (Onesti *et. al.*, 1991). Essa mesma organização estrutural está presente no SPCI. A estrutura do SPCI, ainda em processo de refinamento (dados não mostrados), mostra que o único triptofano está situado na primeira fita- β , dentre as seis que não formam o barril- β , e aquela próxima de uma das ligações dissulfeto situada em uma volta- β .

A conservação estrutural do SPCI com as ligações dissulfeto reduzidas foi confirmada por espectroscopia de dicroísmo circular (figura 17 e tabela VI). A estrutura do SPCI se manteve estável quando submetida aos ensaios de

desnaturação térmica (figura 18). Esses dados mostram que as ligações dissulfeto não têm papel crucial na manutenção da estabilidade estrutural da molécula, o que é corroborado por Souza *et al.* (2000). No entanto, o rompimento dessas ligações provoca mudanças conformacionais importantes, indicadas pela alteração dos valores dos tempos de vida e, conseqüentemente do ambiente do triptofano, que está situado na primeira fita- β próxima de uma das ligações dissulfeto posicionada em uma volta- β .

A estrutura secundária desse inibidor é apenas perturbada sobre aquecimento de 70 a 90°C, e o tratamento do SPCI acima de 90°C, em pH 7,0, não é suficiente para o desdobramento completo da proteína (Teles *et al.*, 2005). No entanto, mesmo que a estrutura do SPCI tenha sido mantida estável sem as ligações dissulfeto, os ajustes das curvas dicróicas para o cálculo do conteúdo das estruturas secundárias indicaram alteração no seu conteúdo percentual (tabela VI). Um aumento da percentagem de folhas β -antiparalela e de estrutura desordenada foi observado, quando comparada ao espectro a 25°C do experimento analisado na figura 19.

O rompimento das ligações dissulfeto promoveu maior flexibilidade conformacional das moléculas, o que pode ser observado pela variação percentual das estruturas secundárias mencionadas acima. Essas alterações, provavelmente, permitiram maior acesso do triptofano ao solvente e/ou aos resíduos polares, aumentando o tempo de vida para os subestados conformacionais.

O tempo de vida monitorado durante a formação do complexo neste experimento foi diferente daquele obtido em condições não redutoras (figura 14). As alterações gráficas observadas na figura 16 indicam que o rompimento das ligações dissulfeto do inibidor provocaram mudanças conformacionais que promoveram o aumento (primeira região do gráfico) e redução (segunda região do gráfico) do tempo de vida.

6.3. Cristalização do complexo binário

Os dados obtidos por difração de raios-X a 2,8 Å (figura 30) já foram coletados e processados, o que permite a resolução e elaboração do modelo da estrutura

tridimensional do complexo para ser depositado no PDB. No entanto, essa segunda parte será realizada em estudos posteriores, como foi proposto em um projeto de doutorado, a ser orientado pela Prof^a Dr^a Sonia M. de Freitas e desenvolvido por mim, avaliado e aprovado recentemente para início no mês de outubro de 2008. Para esse estudo, novas condições de cristalização serão realizadas (refinamentos) para melhorar a qualidade dos cristais e, conseqüentemente, coletar dados de difração de raios-X de melhor resolução, que refletirá na qualidade do mapa de densidade eletrônica e da estrutura tridimensional a ser resolvida.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados acima descritos permitiu concluir que:

1. O extrato bruto apresentou melhor solubilidade em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 3,1 comparado com a água, originalmente utilizada para esse fim. A precipitação de proteínas por TCA a 1,2% para a produção do semi-purificado de SPCI foi a mais apropriada.
2. A atenuação de fluorescência ocorre devido a formação do complexo SPCI- α -quimotripsina por ligação e não por atenuação estática ou colisional.
3. O complexo binário apresenta duas populações distintas de triptofanos: uma exposta e outra enterrada, semelhante à enzima. No caso do SPCI, o decaimento de fluorescência bi-exponencial (dois tempos de vida) caracteriza subestados conformacionais no estado excitado.
4. Na interação do SPCI com a α -quimotripsina ocorre modificações conformacionais nos micro-ambientes dos triptofanos (hidrofílicos e hidrofóbicos), dependentes da concentração da enzima.
5. O NaCl 0,2 M reduziu as forças não-covalentes entre o triptofano e os resíduos circunvizinhos do SPCI e da α -quimotripsina com redução do tempo de vida, porém alterar o número de subestados conformacionais e a distribuição dos triptofanos, respectivamente. Na formação do complexo binário, o sal potencializou a atenuação do tempo de vida a partir de 20 μ M da quimotripsina.
6. A redução das ligações dissulfeto do SPCI não afetou o número de subestados conformacionais do triptofano, mas os valores dos dois tempos de vida aumentaram. Esse aumento é devido provavelmente ao maior acesso do triptofano ao solvente e/ou a resíduos polares.

7. A redução das ligações dissulfeto promoveu aumento nos valores percentuais de folhas β antiparalela, estrutura desordenada e redução na α -hélice, a 25°C. Essas alterações afetaram a via natural de aumento e redução do tempo de vida do processo interativo do SPCI na sua forma não redutora com a α -quimotripsina.
8. As ligações dissulfeto não são fundamentais para a estabilidade estrutural do SPCI.
9. O SPCI apresenta forma monomérica em solução, independente da concentração, do pH e da temperatura.
10. O cristal do complexo binário do SPCI com α -quimotripsina difratando a 2,8 Å foi obtido na condição MES/NaOH 100 mM pH 5.5, PEG 6000 20% (w/v), LiCl₂ 200 mM e sulfobetaina não-detergente 201 (NDSB-201) como aditivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascenzi, P. A. Bocedi, M. Bolognesi, A. Spallarossa, M. Colleta, R. De Cristofaro and Menegatti, E. (2003). The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor). *A Milestone Protein. Curr. Pept. Sci.* 4:231-251.
- Barbosa, J. A. R. G. Silva, L. P. Teles, R. C. L. Esteves, G. F. Azevedo, R. B. Ventura, M. M. and Freitas, S. M. (2007). Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with β -trypsin at 1,55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal*, 92:1638-1650.
- Barret, A. J. & Salvesen, G. (1986). Protease inhibitor. *Elsevier, Amsterdam*. pp 661.
- Barret, A. J. (1980). Introduction: the classification of proteases. Ciba Found. Symp. 75: 1-13. In: Barret, A. J. & Salvesen, G. (1986). Protease inhibitor. *Elsevier, Amsterdam*. pp 661.
- Beece, J. M. Eisenstein, L. Frauenfelder, H. Good, D. Marden, M. C. Reinisch, L. Reynolds, A. H. Sorensen, L. B. and Yue, K. T. (1980). Solvent viscosity and protein dynamics. *Biochemistry*. 19:5147-5157.
- Beechem, J. M. and Brand, L. (1985). Time-resolved fluorescence of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 54:43-71.
- Bergman, M. and Ross, W. F. (1936). On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their activation. *J. Biol. Chem.* 114:717-726.
- Bhattacharyya, A. Rai, S. and Babu, C.R. (2007). A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:169-177.
- Birk, Y. Gertler, A. and Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem. J.* 87:281-284.
- Bode, W. and Huber, R. (1992). Natural protein proteinases inhibitor and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204:433-451.
- Bode, W. and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase – protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Prot. Struct. Mol. Enzymol.* 1477:241-252.
- Capasso, C. Rizzi, M. Menegatti, E. Ascenzi, P. and Bolognesi, M. (1997). Crystal structure of the bovine α -chymotrypsin:kunitz inhibitor complex. An example of multiple protein:protein recognition sites. *J. Mol. Recognit.* 10(1):26-35.
- Borgstahl, G. E. O. (2007). How to use Dynamic Light Scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. Chapter 6. From: *Methods in*

Molecular Biology, vol. 363: *Macromolecular crystallography protocols: volume 1: Preparation and crystallization of macromolecular* edited by: 5. Doublie©Humana Press Inc., Totowa, NJ.

- Branden, C. and Tooze, J. (1991). Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc., N. Y. and London. pp. 234.
- Bridges, J. W. and Williams, R. T. (1968). *Biochem. J.* 107:225-237.
- Brochon, J. C. Whal, P. Charlier, M. Maurizot, J. C. and Helene, C. (1977). Time resolved spectroscopy of the tryptophyl fluorescence of the *E. coli lac* repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79:1261-1271.
- CAB International. (2002). Crop protection compendium. Wallingford, UK.
- Catalano, M. Ragona, L. Molinari, H. Tava, A. and Zeta, L. (2003). Anticarcinogenic Bownan Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self-association behavior. *Biochemistry.* 42:2836-2846.
- Chu, D. Bungiro, R. D. Jr. Ibanez, M. Harrison, L. M. Campodonico, E. Jones, B. F. Mieszczanek, J. Kuzmic, P and Cappello, M. Molecular characterization of *Ancylostoma ceylanicum* kunitz-type serine protease inhibitor: evidence for a role in hookworm-associated growth delay. *Infection and Immunity.* 72(4):2214–2221.
- Murzin, A. G. Lesk, A. M. and Chorthia, C. (1992). Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.* 223:531-543.
- Dasgupta, J. Khamrui, S. Dattagupta, J. K. and Sen., U. (2006). Spacer Asn Determines the Fate of Kunitz (STI) Inhibitors, as Revealed by Structural and Biochemical Studies on WCI Mutants. *Biochemistry.* 45: 6783-6792.
- Dattagupta, J. K. Podder, A. Chakrabarti, C. Sem, C. Mukhopadyay, D. Dutta, S. K. and Singh, M. (1999). Refined crystal structure (2,3 Å) of a double-headed winged bean α -chymotrypsin inhibitor and location of its second reactive site. *Protein.* 35(3):321-331.
- Dayhoff, M. O. Barker, M. C. and Hunt, L. T. (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.* 91:524-545.
- Eftink, M. R. and Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins (review). *Analytical biochemistry.* 114:199-227.
- Ferreira, S. T. Stella, L. and Gratton, E. (1994). Conformational dynamics of bovine Cu, Zn superoxide dismutase revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy of the single tyrosine residue. *Biophysical Journal.* 66:1185-1196.

- Filfil, R. and Chalikian, T. V. (2003). The thermodynamics of protein-protein recognition as characterized by a combination of volumetric and calorimetric techniques: the binding of turkey ovomucoid third domain to α -chymotrypsin. *J. Mol.* 326:1271-1288.
- Franco, O. L. Santos, R. C. Batista, J. A. N. Mendes, A. C. M. Araújo, M. A. Monnerat, R. G. Grossi-de-Sá and Freitas, S. M. (2003). Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry*. 63:343-349.
- Frauenfelder, H. and Gratton, E. (1986). Protein dynamics and hydration. *Methods Enzymol.* 127:207-216.
- Freitas, S. M. (1996). Inibidor trípico e quimotríptico de *Vigna unguiculate* (L) Walp: estrutura tridimensional por homologia; termodinâmica e cinética da interação com α -quimotripsina. Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Biologia Molecular. pp. 207.
- Freitas, S. M. Mello, L. V. Silva, M. C. Vriend, G. Neshich, G. and Ventura, M. M (1997). Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- α -chymotrypsin complex. *FEBS Letters*. 409:121-128.
- Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. & Ladner, J. E. (1994). *Acta Cryst. D*.50:408-413.
- Grinvald, A. and Steinberg, I. Z. (1976). The fluorescence decay of tryptofan residues in native and denatured proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 427:663-678.
- Hartley, B. S. (1970). Homologies in serine proteinases. *Phil. Trans. R. Soc. London B*. 257:77-87.
- Inagaki, K. Kobayashi, H. Yoshida, R. Kanada, Y. Fukuda, Y. Yagyu, T. Kondo, T. Kurita, N. Kitanaka, T. Yamada, Y. Sakamoto, Y. Suzuki, M. Kanayama, N. and Terao, T. (2005). Suppression of urokinase expression and invasion by a soybean Kunitz trypsin inhibitor are mediated through inhibition of Src-dependent signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(36):314228-31437.
- Jancarik, J. and Kim, S. H. *J. Appl. Cryst* (1991). 24:409-411.
- Jancarik, J. Pufan, R. Hong, C. Kim, S. H. and Kim, R. (2004). Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Cryst. D*. 60:1670.
- James, M. N. G. (1976). Relationship between the structures and activities of some microbial serine proteases II. Comparison of the tertiary structures of microbial and pancreatic serine proteases. In: Ribbons, D. W. and Brew, K. (Eds). *Proteolysis and physiological regulations*. M. (1999). Refined crystal structure (2,3 Å of a

- double-headed winged bean α -chymotrypsin inhibitor and location of its second reactive site. *Proteins: Structur. Funct. Genet.* 35:321-331.
- Joanitti, G. A. and Freitas, S. M. (2006). *Current enzyme inhibitor*. Vol. 2, nº 3, 199-217.
- Kennedy, A. R. (1998). Chemopreventive agents: protease inhibitor. *Pharmacology & therapeutics*. 178(3):167-209.
- Kanaujia, S. P. Ranjani, C. V. Jeyakanthan, J. Baba, S. Chen, L. Liu, Z. J. Wang, B. C. Nishida, M. Ebihara, A. Shinkai, A. Kuramitsu, S. Shiro, Y. Sekar, K. and Yokoyama, S. (2007). *Acta Cryst. F*. 63, 27–29.
- Kobayashi, H. Suzuki, M. Kanyama, N. and Terao, T. (2004). A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase up-regulation. *Clin. Exp. Metastasis*. 21:159-166.
- Kobayashi, H. Suzuki, M. Hirashima and Terão, T. (2003). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol. Chem.* 384(5):749-754.
- Kondraganti, S. Gondi, C. S. Gujrati, M. McCutcheon, I. Dinh, D. H. Rao, J. S. and Olivero, W. C. (2006). Restoration of tissue pathway inhibitor (TFPI) inhibits invasion and tumor growth *in vitro* and *in vivo* in a malignant meningioma cell line. *Int. J. Oncol.* 29(1):25-32.
- Kort, A. A. (1981). Specificity and stability of the chymotrypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus*). *Biochim. Biophys. Acta*. 657:212-221.
- Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:331-358.
- Krauchenco, S. Pando, S. C. Marangoni, S. and Polikarpov, I. (2003). Crystal structure of the kuniz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312:1303-1308.
- Krauchenco, S. Silva, J. A. Nagem, R. A. P. Brandão Neto, J. R. Forrer, V. P. Carmona e Ferreira, R. Macedo, M. L. R. Novello, J. C. Maragoni, S. and Polikarpov, I. (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. *Acta Crystallogr. D*. 57:1316-1318.
- Krizaj, I. Drobric-Kosorok, M. Brzin, J. Jerala, R. and Turk, V. (1993). The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Lett.* 333:15-20.
- Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 29:149-154.
- Kunitz, M. and Northrop, J. H. J. (1936). Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin inhibitor, and a inhibitor-trypsin compound. *J. Gen. Physiol.* 19:991-1007.

- IUB Nomenclature Committee. (1984). Enzyme nomenclature. *Academic Press*, New York.
- Joubert, F. J. and Sharon, N. (1985). *Phytochemistry*. 24, 1169.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lakowicz, J. R. (2004). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer. Second edition. p. 698.
- Laskowski, M. Jr. and Qasim, M. A. (2000). What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta*. 1477: 324-337.
- Laskowski, M. and Kato, I. (1980). Protein inhibitor of proteinase. *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626.
- Leite, J. R. S. A. Silva, L. P. Taveira, C. C. Teles, R. C. L. Freitas, S. M. and Azevedo, R. B. (2002). Topographical analysis of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor (SPCI) by atomic force microscopy. *Protein and Peptide Letters*, 9(2):179-184.
- Lehrer, S. S. (1970). *J. Amer. Chem. Soc.* 92:3459-3462.
- Macedo, M. L. R. Matos, D. G. G. Machado, O. L. T. Marongoni, S. Novello, J. C. (2000). Trypsin inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. Purifications and properties. *Phytochemistry*. 54:553-558.
- Macedo, M. L. Freire, M. G. M. Cabrini, E. C. Towama, M. H. Novello, J. C. and Marangoni, S. (2003). A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kueiella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim. Biophys. Acta*. 1621:1-13.
- Major, I. T. and Constabel, C. P. (2008). Functional analysis of the kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiology*. 146:888–903.
- Majeed, S., Ofek, G., Belachew, A., Huang, C. C., Zhou, T. & Kwong, P. D. (2003). *Structure*. 11:1061–1070.
- McCree, D. E. Practical protein crystallography. (1993). San Diego. *Academic Press*.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189, 1–23.
- Meester, P. De Brinck, P. Lloyd, L. F. Blow, M. D. and Onesti, S. (1998). Structure of the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (STI): implication for the interactions

- between members of the STI family and tissue-plasminogen activator. *Acta Crystallogr. D.* 54:589-597.
- Nakaema, M. K. K. and Sanches, R. (1998). Frequency-domain fluorometry: a didactic description of the frequency-domain fluorometry is presented. Its fundamental aspects, the instrumentation and what one can expect from the technique are discussed. Departamento de Física e Informática - Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo (São Carlos – SP).
- Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science.* 224:350-357.
- Newman, J., Egan, D., Walter, T. S., Meged, R., Berry, I., Ben Jelloul, M., Sussman, J. L., Stuart, D. I. & Perrakis, A. (2005). *Acta Cryst. D.* 61:1426–1431.
- Oliveira, A.S. Migliolo, L. Aquino, R.O. Ribeiro, J.K. Macedo, L.L. Andrade, L.B. Bemquerer, M.P. Santos, E. A. Kiyota, S. and de Sales, M. P. (2007). Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiol Biochem.* 45(10-11):858-65.
- Onesti, S. Brick, P. and Blow, D. M. (1990). Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.* 217:153-176.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276:307-326.
- Parr, C and Jiang, W. G. (2006). Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells. *International Journal of Cancer.* 119(5):1176-1183.
- Page, R., Grzechnik, S. K., Canaves, J. M., Spraggon, G., Kreuzsch, A., Kuhn, P., Stevens, R. C. & Lesley, S. A. (2003). *Acta Cryst. D.* 59:1028–1037.
- Privat, J. P. Wahl, P. Achet, J. C. and Pain, R. H. (1980). Time resolved spectroscopy of tryptophyl fluorescence of yeast 3-phosphoglycerate kinase. *Biophys. Chem.* 11:239-248.
- Radisky, E.S. Koshland, D. E. Jr. (2002). A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(16):10316-10321.
- Richardson, M. (1991). Seed storage protein: the enzyme inhibitors. In: Dey, P. M. Harbone, J. B. (Eds). In: *Methods in plant biochemistry, amino acids, proteins and nucleic acids.* Vol. 5. Academic Press, New York. pp 259-305.
- Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitor of plants and microorganism. *Phytochemistry.* 16:159-169.
- Rizzini, C. T. (1971). Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira. Editora USP. p. 128-130. Mizuta, K. & Ventura, M. M. (1976). Isolation

- and some properties of a trypsin inhibitor from seeds of *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 48:577-590.
- Hol, W. G. J. Sarfaty, S. H. Stewart, L. J. and Kim, H. (2001). US Patent 6267935.
- Ross, J. A. Schimdt, C. J. and Brand, L. (1981). Time-resolved fluorescence of the two tryptophans in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* 20:4369-4377.
- Ryan, C. A. (1991). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytol.* 28:425-449.
- Sampaio, C. A. M. Oliva, M. L. V. Tanaka, S. A. and Sampaio, M. U. (1991). Proteinase inhibitor in brazilian leguminosae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86:207-209. Suppl. II.
- Schechter, I and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 27:157-162.
- Shaikh, S. M. T. Seetharamappa, J. Ashoka, S. and Kandagal, P. B. (2006). Spectroscopic studies and life time measurements of binding of a bioactive compound to bovine serum albumin and the effects of common ions and other drugs on binding. *Chem. Pharm. Bull.* 54(4):422-427.
- Shakiba, Y. Mansouri, K. and Mostafaie, A. (2007). Anti-angiogenic effect of soybean Kunitz inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia.* 78:587-589.
- Shashidhara, K. S. and Gaikwad, S. (2007). Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies of α -mannosidase from *Aspergillus fischeri* (NCIM 508). *J. Fluoresc. Short communication.*
- Shukle, R. H. and WA, L. (2003). The role of protease inhibitors and parasitoids on the population dynamics of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ. Entomol.* 32:488-498.
- Skoog, D. A. Holler, F. J. e Nieman, T. A. (2002). Princípios de Análise Instrumental. Editora Bookman. 5ª edição: 322-341.
- Skoog, D. A. West, D. M. Holler, F. J. and Crouch, S. R. (2000). Analytical chemistry: an introduction. Editora Caseboud. 7th edition: 616-625.
- Steitz, T. A. And Shulman, R. G. (1982). Crystallographic and NMR studies of the serine protease. *Annu. Rev. Biochem. Biophys.* 11:419-444.
- Song, H. K. and Suh, S. W. (1998). Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 275:347-363.

- Souza, E. M. T. Mizuta, K. Sampaio, M. U. and Sampaio, C. A. M. (1995). Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *Phytochemistry*. 39(3):521-525.
- Souza, E. M. T. Teles, R. C. L. Siqueira, E. M. A. and Freitas, S. M. (2000). Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *Journal of Protein Chemistry*. 19(6):507-513.
- Souza, E. M. T. (1992). Inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo. Caracterização físico-química e seqüencialmente parcial. Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Biologia Molecular) São Paulo. p 135.
- Sopkova, J. Gallay, J. Vincent, M. Pancoska, P. and Lewit-Bentley, A. (1994). The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry*. 33:4490-4499.
- Subbarao, N.K. and MacDonald, R. C. (1993). Experimental method to correct fluorescence intensities for the inner filter effect. *Analyst*. 118(7):913-916.
- Teles, R. C. L. Calderon, L. A. Medrano, F. J. Barbosa, J. A. G. Guimaraes, B. G. Santoro, M. M. and Freitas, S. M. (2005). pH dependence thermal stability of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Biophysical Journal*. 88:3509-3517.
- Teles, R. C. L. Souza, E. M. T. Calderon, L. A. and Freitas, S. M. (2004). Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. Elsevier. *Phytochemistry*. 65:793-799.
- Teles, R. L. Freitas, S. M. Kawano, Y. Souza, E. M. T. Áreas, and E. P. G. (1999). Vibrational spectroscopic analysis of a chymotrypsin inhibitor isolated from *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo seeds. *Spectrochimica Acta Part A*. 55:1279-1289.
- Teles, R. C. L. Esteves, G. F. Araújo, M. A. M. Bloch, C. Jr, Barbosa, J. A. R. G. and Freitas, S. M. (2007). Crystallization and preliminary crystallographic studies of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor (SPCI) at 1.8 °Å resolution. *Acta Cryst. F*. 63:929-931.
- Troll, W. Wiesner, R. and Frenkel, K. (1987). Anticarcinogenic action of protease inhibitors. *Adv. Cancer Research*. 49:265-283.
- Valueva, T. A. and Mosolov, V. V. (1999). Protein inhibitors of proteinases in seeds. 1. Classifications, distribution, structure and properties. *Russ. J. Plant. Physiol.* 46:307-321.

- Ventura, M. M. Mizuta, K. and Ikemoto, H. (1984). Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 56:217-220.
- Wasylewski, M. Malecki, J. and Wasylewski, Z. (1995). Fluorescence study of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Journal of Protein Chemistry*. Vol. 14, N° 5.
- Wasylewski, M. and Eftink, M. R. (1987). Frequency-domain fluorescence studies of an extracellular metalloproteinase of *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 915:331-341.
- Weber, G. (1961), in "Light and Life", McElroy, W. and Glass, B. Ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md. p. 82.
- Werner, M. H. and Wemmer, D. E. (1992). Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. *Biochemistry*. 31:999-1010.
- Yoshida, C. & Yoshikawa, M. (1975). Purification and characterization of proteinase inhibitors from azuki bean (*Phaseolus angularis*). *J. Biochemi.* 78:935-945. Academic Press, New York. pp. 125-142.

9. ANEXO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

9.1. Espectroscopia de fluorescência

9.1.1. Medidas de fluorescência

As medidas de fluorescência são geralmente classificadas em dois tipos: medidas do estado-fixa e resolvida no tempo. As medidas do estado-fixa são realizadas com iluminação constante. A amostra é iluminada com um feixe de luz contínua e a intensidade ou espectro de emissão é registrado. Devido à escala de tempo ser em nanosegundos, a maioria das medidas é do estado estacionário. Daí, a amostra é primeiramente exposta à luz e quase que imediatamente o estado estacionário é alcançado (Lakowicz, 2004).

O segundo caso, medidas resolvida no tempo, é usado para medir os decaimentos de intensidade ou anisotropia. Para esta medida, a amostra é exposta a um pulso de luz, onde a largura do pulso é tipicamente mais curta do que o tempo de decaimento da amostra. Este decaimento de intensidade é registrado por um sistema de detecção de alta velocidade que permite a intensidade ser medida na escala de tempo em nanosegundos (Lakowicz, 2004).

Os dados resolvidos no tempo frequentemente contêm mais informações que os disponíveis pelos estados estacionários. Por exemplo, considere uma proteína que contém dois triptofanos, cada um deles com tempos de vida diferentes. Devido à sobreposição dos espectros de emissão e excitação, não é possível resolver a emissão a partir de dois resíduos. Portanto, os dados resolvidos no tempo podem revelar dois tempos de decaimentos, os quais podem ser usados para resolver o espectro de emissão e as intensidades relativas dos resíduos de triptofanos. Considerando essas informações, como cada um dos resíduos de triptofano é afetado pelas interações da proteína com seu substrato ou outras macromoléculas? Os triptofanos podem alterar o ambiente do sítio ativo pela sua proximidade estrutural? Esses resíduos em uma região distante podem ser afetados pela ligação do substrato a outro domínio estrutural? Tais questionamentos podem ser respondidos se as medidas dos tempos de decaimento estiverem associadas a cada um dos resíduos de triptofano (Lakowicz, 2004).

A fluorescência resolvida no tempo é dividida em dois principais métodos: no domínio do tempo e no domínio da frequência. No domínio do tempo ou fluorimetria de pulso, a amostra é excitada com um pulso de luz. A largura do pulso é preferencialmente muito mais curta que o do tempo de decaimento τ da amostra (Lakowicz, 2004). A intensidade dependente do tempo é medida seguindo o pulso de excitação. O tempo de decaimento τ é calculado a partir da inclinação do gráfico $\log I(t)$ versus t . Os decaimentos da intensidade são frequentemente medidos por um polarizador orientado a $54,7^\circ$ (“Magic-angle”) a partir do eixo z vertical. Esta condição é usada para evitar os efeitos da difusão rotacional no decaimento da intensidade (Lakowicz, 2004).

O método alternativo de medida do tempo de decaimento é o no domínio da frequência ou modulação de fase. Neste caso a amostra é excitada com luz de intensidade modulada com sinal para a onda seno. A intensidade da luz incidente é alterada em alta frequência ($\omega=2\pi$ vezes a frequência em hertz) comparável à recíproca do tempo de decaimento τ . Quando a amostra fluorescente é excitada desta maneira, a emissão é registrada na mesma frequência de modulação. Para o tempo de vida da amostra, a emissão é atrasada em relação à excitação. Este atraso é medido como um deslocamento de fase (ϕ), o qual pode ser usado para calcular o tempo de decaimento (Lakowicz, 2004).

9.1.2. Tempo de vida de fluorescência

A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância que ocorre a partir dos estados eletronicamente excitados, podendo ser dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência ocorre tipicamente com moléculas aromáticas. No estado singleto excitado, o elétron no orbital excitado é pareado (spin oposto) ao segundo elétron no orbital do estado fundamental. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente de 10^8 s, de modo que um tempo de vida de fluorescência típico é da ordem de grandeza de nanosegundos. O tempo de vida (τ) de um fluoróforo é a média do tempo entre sua excitação e seu retorno ao estado

fundamental. Muitos fluoróforos apresentam tempos de vida em nanosegundos. Por causa da curta escala de tempo de fluorescência, a medida da emissão resolvida no tempo requer equipamentos ópticos e eletrônicos sofisticados. Apesar das dificuldades experimentais, a fluorescência resolvida no tempo é amplamente praticada devido ao aumento da informação disponível a partir dos seus dados quando comparado às medidas do estado estacionário (Lakowicz, 2004; Skoog *et al.*, 2002).

A intensidade da fluorescência pode ser diminuída por uma ampla variedade de processos. Essas diminuições na intensidade da fluorescência são chamadas de “atenuações”. Uma variedade de interações moleculares pode resultar nessa atenuação. Estas incluem reações do estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e atenuação colisional (Lakowicz, 2004; Skoog *et al.*, 2000).

Devido às propriedades ópticas de determinadas amostras pode ocorrer atenuação aparente. Por exemplo, altas densidades óticas ou turbidez podem resultar na diminuição da intensidade de fluorescência (Lakowicz, 2004).

Existem dois tipos de atenuações provocadas pelo contato molecular: dinâmico e estático. Na atenuação estática, um complexo não fluorescente é formado entre o fluoróforo e outra molécula em solução, o qual é chamado de atenuador. Já na atenuação colisional, também chamada de dinâmico, o fluoróforo no estado excitado é desativado sob contato com seu atenuador, retornando ao estado fundamental com diminuição da emissão (Lakowicz, 2004).

9.1.3. Atenuação dinâmica ou colisional

Neste caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante aproximação com o atenuador. As moléculas não são quimicamente alteradas nesse processo. A atenuação colisional de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + k_D [Q]$$

Nesta equação, F_0 e F são intensidades de fluorescência na ausência e presença do atenuador, respectivamente, k_q é a constante de atenuação bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do atenuador e $[Q]$ é a concentração do atenuador. A constante de atenuação de Stern-Volmer é dada por $k_q\tau_0$. Se a atenuação for dinâmica, a constante de Stern-Volmer será representada por K_D . De outra maneira, esta constante será descrita com K_{sv} (Lakowicz, 2004).

Os dados de atenuação são frequentemente apresentados como gráficos de F_0/F versus $[Q]$. Isto porque F_0/F é esperado ser linearmente dependente da concentração do atenuador. O gráfico de F_0/F versus $[Q]$ resulta em uma reta com o cruzamento em 1 no eixo y e uma inclinação igual a K_D . K_D^{-1} é a concentração do atenuador na qual F_0/F é igual a dois, ou 50% da intensidade atenuada. O gráfico de Stern-Volmer quando apresenta a forma linear indica geralmente uma única classe de fluoróforos, todas igualmente acessíveis ao atenuador. Se duas populações de fluoróforos estão presentes e uma delas não é totalmente acessível ao atenuador, o gráfico de Stern-Volmer desvia da linearidade para a forma exponencial. Esse desvio da linearidade é frequentemente encontrado para atenuação da emissão fluorescência de triptofano com atenuadores polares ou carregados. Estas moléculas não penetram prontamente no interior hidrofóbico das proteínas e somente aqueles resíduos de triptofanos na superfície são atenuados (Lakowicz, 2004; Eftink e Ghiron, 1980).

A atenuação colisional é caracterizada pela relação entre o estado fundamental e o excitado, sendo que este último tende a diminuir. Os tempos de vida de fluorescência na ausência (τ_0) e presença (τ) do atenuador é dada por:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_q [Q]$$

Na atenuação colisional ocorre uma diminuição na intensidade de fluorescência e no tempo de vida sendo válida a relação abaixo (Lakowicz, 2004; Eftink e Ghiron, 1980).

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$$

Esta diminuição no tempo de vida ocorre porque a atenuação é um processo adicional que despopulaciona o estado excitado. A diminuição no rendimento quântico ou da emissão fluorescente ocorre porque a atenuação despopulaciona o estado excitado sem emissão de fluorescência. Na atenuação estática o tempo de vida não diminui porque somente as moléculas fluorescentes são observadas e os fluoróforos não complexados apresentam tempo de vida característico de fluoróforo na ausência do atenuador (τ_0) (Lakowicz, 2004).

Nos processos de atenuação de fluorescência, a constante de atenuação bimolecular (k_q) reflete a eficiência da atenuação ou a acessibilidade dos fluoróforos ao atenuador. A atenuação de difusão controlada tipicamente resulta em valores de k_q próximos de $1,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Valores menores de k_q pode ser resultado de uma proteção estérica do fluoróforo e valores aparentemente maiores de k_q frequentemente indicam algum tipo de ligação no microambiente do fluoróforo (Lakowicz, 2004). O significado de k_q está relacionado com a frequência de colisões entre as moléculas difundindo livremente. A frequência colisional (Z) de um fluoróforo com um atenuador é dada por:

$$Z = k_0 [Q]$$

Onde k_0 é a constante da taxa bimolecular de difusão controlada. Esta constante pode ser calculada usando a equação de Smoluchowski:

$$k_0 = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000} (R_f + R_q)(D_f + D_q)$$

Onde R é o raio de colisão, D é a soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo (D_f) e do atenuador (D_q) e N é o número de Avogadro. Os raios colisionais são conhecidos como a soma dos raios moleculares do fluoróforo (R_f) e do atenuador

(R_q). Esta equação descreve o fluxo de difusão de uma molécula com um coeficiente de difusão D através de uma superfície de esfera de raio R . O fator 1000 é necessário para corrigir as unidades quando a concentração é expressada em molaridade. O termo $N/1000$ converte molaridade em moléculas por centímetro cúbico (Lakowicz, 2004; Eftink e Ghiron, 1980).

A frequência colisional está relacionada com k_q pela eficiência de atenuação (f_Q),

$$k_q = f_Q k_0$$

Por exemplo, se $f_Q = 0,5$, então 50% dos encontros colisionais são efetivos na atenuação e a k_q é 1/2 de k_0 . Visto que k_0 pode ser estimado com moderada precisão, o valor observado de k_q pode ser usado para analisar a eficiência da atenuação (Eftink e Ghiron, 1980).

A eficiência da atenuação pode ser calculada a partir dos valores de k_q se os coeficientes de difusão e raios moleculares são conhecidos. Os raios podem ser obtidos a partir de modelos ou massas moleculares e densidades das substâncias em questão (Lakowicz, 2004). Os coeficientes de difusão pode ser obtido a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Onde k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente e R é o raio molecular.

9.1.4. Atenuação estática

No item anterior, foi descrito a atenuação que resulta de colisões difusivas entre o fluoróforo e o atenuador durante o tempo de vida do estado excitado e dependente do tempo. A atenuação estática ocorre como resultado da formação de um complexo

não fluorescente entre o fluoróforo e o atenuador. Quando este complexo absorve luz imediatamente retorna ao estado fundamental sem emitir fótons (Lakowicz, 2004).

A dependência da intensidade da fluorescência com a concentração do atenuador na atenuação estática é analisada considerando a constante de associação para a formação do complexo. Dessa maneira, a equação de Stern-Volmer, que descreve o fenômeno, é dada por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_S[Q]$$

A dependência de F_0/F em relação a $[Q]$ é linear e idêntica ao observado para o atenuação dinâmico, exceto para a constante de atenuação que nesse caso é uma constante de associação (Lakowicz, 2004).

Os fluoróforos complexados não fluorescem e a fração não complexada não é perturbada e apresenta o mesmo valor para o tempo de vida (τ_0). Portanto, para a atenuação estática, $\tau_0/\tau=1$, contrastando com a atenuação dinâmico, onde $F_0.F^{-1} = \tau_0.\tau^{-1}$ (Lakowicz, 2004).

O gráfico de Stern-Volmer na sua forma linear não distingue a atenuação colisional da estática. A magnitude de K_S pode ser usada para demonstrar que a atenuação dinâmica não pode explicar a diminuição da intensidade (Lakowicz, 2004).

A atenuação dinâmica depende da difusão. Em temperaturas mais altas, os valores dos coeficientes de difusão e K_q aumentam com a temperatura. K_q é proporcional ao T/η e os coeficientes de difusão são proporcionais ao raio. Em contraste, o aumento da temperatura diminui a estabilidade do complexo, e assim, tem-se valores mais baixos de K_S (Lakowicz, 2004).

A atenuação dinâmica afeta somente o estado excitado dos fluoróforos e, por isso, nenhuma mudança no espectro de absorção é esperada. No entanto, a formação do complexo no estado fundamental resultará frequentemente na perturbação do espectro de absorção do fluoróforo. Devido a essas diferenças relatadas, as medidas do tempo de vida de fluorescência é o método mais preciso para distinguir esses dois tipos de atenuação (Lakowicz, 2004).

9.1.5. Combinação de ambos os tipos de atenuação

Muitos fluoróforos podem ter sua intensidade de fluorescência atenuada pelos dois tipos de atenuação (estática e dinâmica) com o mesmo atenuador. O gráfico de Stern-Volmer em tais condições apresenta curvatura côncava voltada para o eixo das ordenadas. A equação que descreve esse fenômeno é a forma modificada da equação de Stern-Volmer:

$$\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) \frac{1}{[Q]} = K_D K_S [Q] + (K_D + K_S)$$

O gráfico de $\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) \frac{1}{[Q]}$ versus $[Q]$ resulta em uma reta que cruza a ordenada em $(K_D + K_S)$ e com a inclinação em $K_D K_S$. Os valores individuais podem ser obtidos a partir das duas soluções da equação quadrática desenvolvida (Lakowicz, 2004).

9.2. Espalhamento de luz dinâmico

Existem vários métodos que podem ser usados para medir o estado de agregação, tamanho e oligomerização de moléculas, incluindo equilíbrio de sedimentação, cromatografia de exclusão molecular, eletroforese em gel, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e espalhamento de luz a ângulo fixo. Destes, o espalhamento de luz dinâmica (ELD), também conhecida como “quasielastic light scattering”, tem sido o mais indicado, por ser mais rápido e menos destrutivo para a amostra (Borgstahl, 2007).

Para as medidas de espalhamento de luz dinâmico, a solução de proteína é iluminada por um laser. As moléculas em solução estão em movimento Browniano, o qual provoca flutuações na intensidade da luz espalhada. Esta mudança na intensidade da luz é medida por um detector localizado a um ângulo de 90° em relação à luz do laser incidente. O coeficiente de difusão translacional (D_T) é obtido a partir deste dado usando uma função de auto-correção (Borgstahl, 2007).

As partículas pequenas difundem-se mais rapidamente que as grandes. O raio hidrodinâmico (R_H) das moléculas em solução pode ser calculado a partir de D_T . Em geral, as partículas devem diferir 50%, ou mais, quanto ao R_H para ser bem separada pelo ELD. A massa molecular (M_m) pode ser também estimada se a forma da molécula é assumida em esférica ou alongada (Borgstahl, 2007).

O ELD, como um estimador de M_m , não é o mais indicado e deve ser usado com cautela. As definições de forma usadas para estimar a M_m podem não representar eficientemente as partículas em solução, e pela amostras polidispersas o R_H e M_m serão baseados na média ponderada de mais de uma espécie (Borgstahl, 2007).

9.3. Cristalização

Existem várias técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas, todas têm como princípio levar a macromolécula biológica em solução para um estado de supersaturação.

O método utilizado neste trabalho, e também o mais comum, foi o método de difusão de vapor. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez na cristalização da tRNA por Hampel e cols em 1968. O princípio é o mesmo, quer para gotas suspensas (*hanging drops*), gotas sentadas (*sitting drops*) e gotas sanduíches (*sandwich drops*).

Neste método, uma gota contendo a proteína a ser cristalizada em solução com um agente precipitante e aditivo é equilibrada contra a solução do precipitante, em reservatório apropriado. A concentração do precipitante no reservatório é mais alta do que na gota. Esse sistema deve ser mantido à temperatura controlada, num meio completamente fechado e sem vibrações externas. O equilíbrio prossegue lentamente por meio da difusão de vapor até que a concentração do precipitante na gota se iguale àquela do reservatório. Isto leva a uma diminuição do volume da gota, e, conseqüentemente a um aumento na concentração da proteína. Durante esse período de equilíbrio da concentração de precipitante nas duas fases, a proteína atinge um estado de supersaturação, termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver uma organização cristalina das moléculas em solução.

A elucidação da estrutura tridimensional de proteínas por difração de cristais por raios-X está condicionada à obtenção de cristais de tamanho e qualidade que possibilitem a coleta de dados em difratômetros apropriados. Os principais fatores

que podem influenciar, promovendo ou evitando a cristalização de proteínas são: pH, força iônica, concentração dos precipitantes (sal, polímero, reagentes orgânicos voláteis e não volátil), aditivos (cátions, ânions, detergentes, agentes caotrópicos e outros), temperatura, vibrações, volume da amostra, contaminação por microorganismos, presença de material amorfo, proteólise, pressão, viscosidade da solução estoque de proteína, detergentes, concentração da macromolécula, metais e outros íons específicos, pureza da amostra, e outros. A procura da melhor condição experimental para a obtenção de cristais envolve tempo e depende de todas as variáveis acima mencionadas.

Considerando esse elevado número de variáveis para cristalização de proteínas, foi proposto o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991), onde diversas condições diferentes são experimentadas para se cristalizar a macromolécula biológica em várias combinações. No método da matriz esparsa três categorias de parâmetros que afetam a cristalização são consideradas como variáveis principais: pH e reagentes para solução tampão, aditivos e agentes precipitantes. Por tentativa e erro a matriz foi simplificada eliminando-se as condições que podem ser parcialmente representadas por resultados de outras condições.

A empresa Hampton Research (USA) simplificou o método original e disponibiliza kits específicos de condições de cristalização, que foram utilizados para a realização deste trabalho. Assim, um número limitado de condições de cristalização foi testado, usando-se pequenas quantidades de proteína. Para um primeiro ensaio são necessários aproximadamente 5-10 mg de proteína. Além disso, atualmente um sistema automatizado, robô para montagem de placas e preparo de soluções, tem sido utilizado minimizando o volume de amostra e também o tempo de montagem das placas de cristalização.