

JOSÉ ANTONIO DA SILVA

ASPECTOS ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS E
CONFORMACIONAIS DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI DE
SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii*.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JOSÉ ANTONIO DA SILVA
Sérgio Marangoni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/UNICAMP
	SI 385a
V	
TOMOS	66205
PREÇO	16: 86-05
PREÇO	11,00
DATA	9/11/05
Nº CPD	

BIB ID: 373202

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si385a

Silva, José Antonio da

Aspectos estruturais, funcionais e conformacionais do inibidor de tripsina CTI de sementes de *Copaifera langsdorffii* / José Antonio da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Sérgio Marangoni.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Inibidores da tripsina. 2. Sementes. I. Marangoni, Sérgio.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

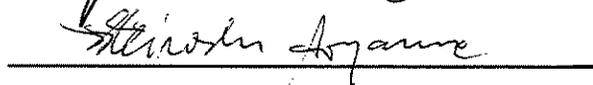
Data da Defesa: 13 de Dezembro de 2004.

Banca Examinadora

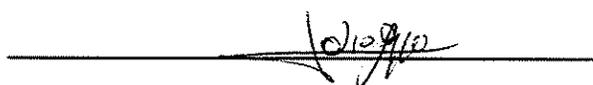
Prof. Dr. Sérgio Marangoni



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama



Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo



Profa. Dra. Daniela Diógenes de Carvalho

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto



Prof. Dr. Paulo Afonso Granjeiro



Prof. Dr. José Camillo Novello



2005.04.8.68

VIVER CADA SEGUNDO COMO SE FOSSE ÚNICO E TALVEZ O ÚLTIMO

Agora chegou a difícil hora de escrever os agradecimentos, difícil por ser a última parte da tese, normalmente, já estamos de saco cheio com tudo e com todos, não querendo agradecer a ninguém e ao mesmo tempo ao mundo. Cheguei a pensar em copiar e colar aquele do mestrado, mas me lembrei de quantas vezes eu abri uma tese e li somente os agradecimentos, talvez para ver se tinha o meu nome. Quem nunca fez isso? Por ser a primeira ou talvez a única parte da tese para algumas pessoas, acho que será um tanto agradável abrir mão do modelo de agradecimentos ortodoxo e escrever uma crônica, que é mais a minha cara.

Aprendi muitas técnicas durante o desenvolvimento desta tese, sendo possível à realização de um trabalho científico que me deu muito prazer. Não poderia deixar de mencionar em um primeiro momento o precioso apoio financeiro e científico da FAPESP, sem o qual não seria possível o cabo deste trabalho. Profissionalmente, tenho a agradecer aos Professores Sérgio Marangoni e José Camillo Novello. Foram várias as oportunidades, permitindo o desenvolvimento experimental no parque tecnologicamente instalado do LAQUIP. Obrigado por ter mostrado o caminho burocrático que uma proteína deve prosseguir para ser caracterizada estruturalmente e funcionalmente, de forma a explorar uma melhor aplicação para tal molécula.

Acho que também devo ser muito grato ao tamanho incentivo que vocês sempre me deram na docência do ensino superior, se não fosse a liberdade e a confiança de vocês, talvez não saberia nem um por cento do que aprendi de Bioquímica durante esses anos. Quantas discussões sobre rolaram e ainda acontecem. Deixo evidente, como foi prazeroso, trabalhar todos esses anos com os Alunos da Biologia do Noturno. A vocês galera de 1999, 2000, 2001 e 2002, por me ensinarem muito nessa vida, principalmente a respeitar a todos e a ser respeitado, obrigado pelo crédito depositado.

Não posso esquecer de agradecer o Professor Benê, uma lenda vida, considerado a gênese dos proteinólogos do LAQUIP. Valeram os esforços dos Professores Sérgio e Camillo em costurar diversas colaborações. Muito obrigado Professor Igor Polikarpov e sua aluna Sandra Krauchenco pela valiosa colaboração em desvendar a arquitetura tridimensional da molécula em estudo. Obrigado Professores Marcos Eberlin e Fabio Gozzo do Instituto de Química pelos esforços em detalhar, em desvendar o quebra cabeça que foi o sequenciamento da estrutura primária de CTI. Ainda do Instituto de Química, devo agradecer o Professor Francisco B. Teixeira Pessine pela oportunidade de

aprender um pouco sobre dicroísmo circular e fluorescência. Ao pessoal do Laboratório de Enzimologia dos Professores Hiroshi e Carmen, obrigado por ter me adotado muitas vezes que eu me rebelava no LAQUIP. Acho que não esqueci de nenhuma colaboração, mas adianto que só foi possível a realização deste trabalho em função das sólidas colaborações estabelecidas com grupos diferentes. Confesso que me sinto atualmente mais um químico do que um biólogo, que é minha formação.

Apreendi que estamos constantemente vivendo fases em nossas vidas, e por isso, devemos viver cada segundo como se fosse o único ou talvez o último. Essa fase que acredito estar finalizando, teve início em junho de 2000. Engraçado como somos saudosistas, vivia intensamente a vida acadêmica, científica e pessoal até dezembro de 2001, quando uma nuvem escura literalmente estacionou sob minha visão. Por um momento, acreditei em um fim, e me vi assustado e possuidor de uma fé que eu não sabia da sua existência. Como algumas pessoas foram fundamentais nestes dias tão confusos. Não poderia me esquecer de fazer uma menção especial em primeiro lugar a minha mãe *JOSEFA* ou *Dona ZEFA*, uma mulher de fibra, de caráter incontestável e de uma força espiritual inigualável. Sob um gesto modesto, tenho a lhe dizer que sou mui grato por ter vindo a esse mundo e que tenho muito orgulho de falar que sou seu filho. Nessa fase, pude contar com um grupo de amigos que às vezes se confundiam como irmãos ou talvez mais que isso. Quanta cumplicidade entre nós. Não sei descrever como seria na ausência de vocês, em ordem alfabética para não ter brigas: Alexandre, Luciana (Luca), Mário, Paulo Castilho, Paulo Fernandes, Paulo Granjeiro, João, Zefa e família. Só vocês sabem o que eu quero dizer nas frases logo acima!!!

Ao amigo Sérgio Marangoni, por ensinar um pouco de vida, duas lições não esquecerei jamais. São elas: não acender vela para defunto errado e saber escolher os seus inimigos. Outra frase não sua, mas oportuna ao momento, diz respeito: "chegar um gatinho inofensivo em qualquer lugar e se preciso sair como um leão". Consegui encontrar ou pelo menos, estou sempre a procura deste equilíbrio, tentando sempre lutar pelo predomínio do bom senso. Ao grande Balda, a viúva deste barco de piratas!! Quantas chaves!! Nem preciso te elogiar, te considero muito cara!! Obrigado pelas florestas tombadas durante todo esses anos. Que os ecólogos não te predam por quebrar galhos de tanto gente. Quando eu crescer quero ser como você, espero sempre estar disposto como você é com todas as pessoas que lhe procuram. Confesso que às vezes tive vontade e cheguei a te mandar para a *pqp*. Mas descobri que só nos irritamos com quem a gente gosta.

Agora começo a agradecer aos bloquinhos de amigos, todos eles de igual importância durante esta trajetória. Em primeiro, aos meus amigos-irmão Granja e Castilho. Sinto-me privilegiado em ser amigo de pessoas tão íntegras, tão sinceras e tão tudo!!! Valeu pelos jantares, risadas, pelo incentivo um ao outro, quando o desânimo aflorava. Engraçado, mas apesar idades diferentes, a impressão que tenho, é que nascemos por partenogênese. Aos irmãos da segunda partenogênese: Mário, Alexandre e Neto deixo o meu grande abraço. Os almoços no Belo não seriam o mesmo se não fosse o povo da Biomembrana. Quantas atualizações ou história de vida (lê-se fofocas)!!! Quantas picaretagens, mas sempre com ética!!! E nunca esquecer do lema, o que se escuta no Belo, morre imediatamente lá. É isso aí Dani Morango, Dani Japipa, Nonô, Paulo Castilho, Menino Bispo, Cíntia, Raquel, Juliana, Cleyton, Dona Cidinha, Márcio e os demais. Destaque para Daniele Morango e Nonô, obrigado por sempre ouvir minhas conversas furadas de finais de semana e por contar a de vocês. Obrigado Morango e Teresa da FAJ pelas sugestões e correções da tese.

Em alguns momentos, percebia que estava completamente perdido na orientação dos meus alunos de iniciação. Valeu Bruno, Marcelo Mattioli, Júlio, Ana Giora, Contra Mão, Zelão e Guilherme. Confesso que sempre procurei propor soluções que talvez nem sempre eu conhecia, mas chegávamos juntos a uma resposta para o problema. Ao doutorando Bruno, você não tem idéia o quanto te admiro e te respeito, espero sempre contar com essa força e bola para frente. Teve uma figura que foi muito gente fina e profissional no laboratório, esse é Marcus Smolka, valeu mesmo pela força, pelas discussões, não poderia esquecer todos os agregados do proteoma, em especial a Flavinha (menina de ouro) ao grande Java, Rafael, Paulinha, Diego e Fernandinha.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade cultivada. Aos eternos companheiros do LAQUIP: Luzia, Bayki, Adriana, DaniDinha, Verinha, Silvana, Marcão e de outros laboratórios: Leonardo, André Hiroshinho, Márcio Miranda, Alexandre e Érika por ter convivido, e pelas possíveis contribuições. Finalmente a duas pessoas muito importantes: minha adorável mãe Dona Josefa e ao meu Irmão Antonio João pela força (moral, física, psicológica e financeira) sempre constante e a minha nova cunhada Marta. Finalizo oferecendo toda energia positiva deste universo às pessoas que apavoram as conexões da arrogância, da intolerância, da insensibilidade e de muitos outros *in* relacionados à diversidade no seu sentido mais amplo.

ZECA - 2004

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUÇÃO	01
65 ANOS DE HISTÓRIA DOS INIBIDORES DE SERINOPROTEASE TIPO KUNITZ	01
PROTEASES E SEUS INIBIDORES	02
INIBIDORES DE KUNITZ	04
OCORRÊNCIA NOS VEGETAIS	04
ASPECTOS ESTRUTURAIS	05
ASPECTOS FUNCIONAIS	10
ESTABILIDADE E ASPECTOS CONFORMACIONAIS	12
ASPECTOS EVOLUTIVOS	13
FUNÇÕES BIOLÓGICAS & APLICABILIDADES	14
PERDAS NA PRODUÇÃO DE GRÃOS	15
MECANISMO DE DEFESA DE PLANTAS	16
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIAIS	21
A PLANTA – SEMENTE DE <i>Copaifera langsdorffii</i>	21
REAGENTES	22
IV. MÉTODOS	23
01. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ISOFORMAS DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI	23
REDUÇÃO E CARBOXIMETILAÇÃO DAS SUBUNIDADES DE CTI	23
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – TRICINA	23
DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL DE AMINOÁCIDOS	24
ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS	26
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	27
02. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)	32
CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	32
SEQUENCIAMENTO DO INIBIDOR CTI	37
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA IN GEL	37
USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA NO SEQUENCIAMENTO DE CTI	39
3. ESTUDOS CRISTALOGRAFICOS E ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	41
CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE CRISTALOGRAFIA DE PROTEÍNAS	41
CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR CTI	46
PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE CRISTAIS DE CTI	47
COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	48
DETERMINAÇÃO DA SUBESTRUTURA DOS ÁTOMOS PESADOS	48
DETERMINAÇÃO DAS FASES DOS FATORES DE ESTRUTURA	49
CONSTRUÇÃO AUTOMÁTICA DO MODELO	49
AJUSTE MAUNAL DO MODELO	49
04. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI	50
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA	50
ESTUDO DA INTERAÇÃO DE CTI COM A PROTEASE TRIPSINA	51
EFEITOS DE REAGENTES MODIFICADORES NA ATIVIDADE DO INIBIDOR CTI	51
ALTERAÇÃO FUNCIONAL – ESTUDOS CINÉTICOS	52
ALTERAÇÃO ESTRUTURAL – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA	52

05. ESTABILIDADE FUNCIONAL E CONFORMACIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)	53
CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE DICROÍSMO CIRCULAR E FLUORESCÊNCIA	53
DICROÍSMO CIRCULAR (CD) DO INIBIDOR CTI	57
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE CTI	58
EFEITO DO DITHIOTHREITOL (DTT)	58
EFEITO DO pH EM TEMPERATURAS DISTINTAS	59
EFEITO DE AGENTES CAOTRÓPICOS	60
CÁLCULOS DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS	60
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
01. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ISOFORMAS DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI	62
MASSA MOLECULAR DAS SUBUNIDADES DE CTI	62
ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DE CTI-I E CTI-II	63
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS SUBUNIDADES DE CTI	64
DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CISTEÍNAS EM CTI	66
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS SUBUNIDADES DE CTI	67
ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	68
ESPECTRO DE MASSAS DOS DIGESTOS TRÍPTICO DAS ISOFORMAS DE CTI	70
02. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO INIBIDOR CTI DE TRIPSINA	77
SEQUENCIAMENTO DA SUBUNIDADE CTI-I (SPOT A) DO INIBIDOR CTI	77
SEQUENCIAMENTO DA SUBUNIDADE CTI-II (SPOT F) DO INIBIDOR CTI	79
MAPEAMENTO DOS PEPTÍDEOS E ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO INIBIDOR CTI	81
03. ESTUDOS CRISTALOGRAFICO E TRIDIMENSIONAL DO INIBIDOR CTI	86
CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR	86
DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	88
ARQUITETURA GLOBAL DO MODELO TRIDIMENSIONAL DE CTI	89
ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO MODELO DE CTI	90
CTI É CONSTITUÍDO POR DUAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS	91
O INIBIDOR CTI APRESENTA APENAS UMA PONTE DISSULFETO	92
04. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)	97
INTERAÇÃO DE CTI COM A TRIPSINA	97
RELAÇÃO DO LOOP REATIVO E FUNÇÃO DO INIBIDOR CTI	99
FORMAÇÃO DO COMPLEXO TRIPSINA-INIBIDOR CTI	100
EFEITOS DE REAGENTES MODIFICADORES NA ATIVIDADE DO INIBIDOR CTI	101
05. ESTABILIDADE FUNCIONAL E CONFORMACIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)	111
DICROÍSMO CIRCULAR DE CTI	111
EFEITO DO DITHIOTHREITOL (DTT)	112
EFEITO DO pH EM TEMPERATURAS DISTINTAS	114
EFEITO DE AGENTES CAOTRÓPICOS - URÉIA	115
EFEITO DE AGENTES CAOTRÓPICOS - CLORETO DE GUANIDINA	120
VI. CONCLUSÕES	134
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
VIII. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA	154
IX. APÊNDICE	164

RESUMO

As técnicas utilizadas no esclarecimento de estruturas macromoleculares estão situadas em campos interdisciplinares, onde os pesquisadores encontram-se unidos por um interesse comum, no sentido de detalhar o entendimento da função biológica e a relação com sua estrutura primária e tridimensional. Os inibidores de sementes de leguminosas são encontrados sob várias isoformas. Alguns métodos, como a espectrometria de massas, determinação da seqüência N-terminal e eletroforese bidimensional, vêm sendo amplamente explorados com o propósito de caracterizar melhor as isoformas presentes em sementes.

A eletroforese bidimensional do inibidor de tripsina de Copaíba (CTI) revelou a presença de vários *spots* na faixa de 11 e 9 kDa. CTI foi resolvido em dois picos (CTI-I e CTI-II) quando submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC. Esses picos distintos foram submetidos à eletroforese bidimensional sendo três *spots* observados para CTI-I com *pI* de 8.0, 8.5 e 9.0 e três *spots* para CTI-II com *pI* de 4.7, 4.6 e 4.3. A análise por espectrometria de massa foi realizada para as subunidades CTI-I e CTI-II objetivando determinar as massas moleculares acuradas e prováveis números de isoformas para cada subunidade. Os espectros confirmaram uma heterogeneidade para CTI-I e CTI-II com predominância dos picos de massa 10.719 e 8.244, respectivamente.

A impossibilidade em seqüenciar todos os *spots* para cada subunidade de CTI, norteou a escolha dos *spots* A e F de forma continuar os estudos de sequenciamento. Os *spots* A e F foram submetidos a digestões enzimáticas com as proteases tripsina, SV8 e clostripaína. A massa exata dos peptídeos de cada digesto foi determinada por espectrometria de massas utilizando MALDI-TOF. Os peptídeos mais intensos foram purificados e seqüenciados em um HPLC capilar acoplado ao espectrômetro de massas ESI QTOF.

A estrutura primária final de CTI, determinada a partir da massa dos peptídeos das digestões enzimáticas e da seqüência obtida por espectrometria de massas indicou 182 resíduos de aminoácidos, apresentando elevado grau de homologia em relação a outros inibidores de tripsina do tipo Kunitz de vegetais; inclusive com o resíduo de arginina na posição do sítio reativo. A estrutura cristalográfica CTI foi resolvida, revelando que este inibidor é composto por duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas e possui apenas uma ponte dissulfeto. Apesar dessas diferenças estruturais, CTI é um inibidor efetivo de tripsina com uma constante de dissociação de 1,2 nM, da mesma ordem de grandeza que os inibidores padrões como STI, ETI

ou WCI. Sua estrutura tridimensional revela que isso se deve ao fato de que as discrepâncias estruturais não afetam a conformação canônica do seu *loop* reativo.

A comparação entre a seqüência deduzida dos mapas experimentais da densidade eletrônica e a seqüência determinada por 2D-PAGE e espectrometria de massas MALDI-TOF e ESI-QTOF, mostra um acordo de aproximadamente 75%, que pode ser devido à presença de várias isoformas que é um aspecto comum das proteínas extraídas de sementes. Experimentos objetivando a determinação dos resíduos de aminoácidos importantes na atividade inibitória de CTI foram realizados utilizando reagentes modificadores específicos. O inibidor CTI foi inativado em 48 e 81% por EDC e PGO, respectivamente. Esses compostos atuam em grupos carboxila de Asp e Glu (EDC) e resíduos de arginina (PGO), indicando funcionalmente a importância do resíduo de arginina na interação do inibidor com a protease.

Estudos da estabilidade conformacional em diferentes pHs, temperaturas e agentes caotrópicos fornecem importantes informações sobre a biogênese e estrutura das proteínas. Um estudo verificando o efeito de agentes físico-químicos (pH, temperatura, DTT, uréia e cloreto de guanidina) na estabilidade conformacional do inibidor de tripsina (CTI) purificado de sementes de *Copaifera langsdorffii* foi realizado. CTI, um inibidor atípico da família Kunitz, demonstrou ser resistente em sua estabilidade funcional, apesar de sofrer prejuízos na estrutura quaternária após redução em 1mM DTT como evidenciado por SDS-PAGE, gel filtração em protein-pack, experimentos cinéticos, espectros de fluorescência e de dicroísmo circular.

Os experimentos de desnaturação em função dos agentes caotrópicos foram monitorados pela intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano. A desnaturação de CTI na presença de agentes caotrópicos mostrou ser um processo reversível após diálise, para estrutura e função no caso da uréia e do cloreto de guanidina. Os resultados indicaram que a desnaturação de CTI envolve pelo menos dois estágios: nativo e desnaturado. A presença de 3.5 M de uréia ou GdnHCl inibiu 50% e 100% da atividade inibitória, respectivamente. Ambos agentes caotrópicos promoveram um deslocamento do centro de massa. O cálculo da estabilidade conformacional ΔG (H₂O) foi feito tomando-se o deslocamento nos comprimentos de onda máxima de emissão de fluorescência como parâmetro. O ΔG (H₂O) em função da concentração de uréia e guanidina foi de 63.0 e 54.0 Kcal mol⁻¹, respectivamente. Os cálculos de centro de massa foram tomados em função da concentração do agente desnaturante em ambos os casos.

ABSTRACT

The techniques used in the clarification of macromolecular structures are situated in interdisciplinary fields, where the researchers find themselves united by a common interest in detailing the agreement of the biological function and the relation with its primary and three-dimensional structure. The inhibitors of leguminous seeds are found under several isoforms. Some methods, as the mass spectrometry, determination of the N-terminal sequence and bidimensional electrophoresis have been widely explored with the purpose of better characterizing these isoforms in seeds.

The bidimensional electrophoresis of the Copaiba trypsin inhibitor (CTI) disclosed to the presence of several spots in the 9 and 11kDa. CTI was resolved in two peaks (CTI-I and CTI-II) when submitted to the reverse phase chromatography in C18 column in HPLC system. These distinct peaks had been submitted to bidimensional electrophoresis, 3 spots had been observed for CTI-I with pI of 8.0, 8.5 and 9.0 and three spots for CTI-II with pI of 4.7, 4.6 and 4.3. The analysis for mass spectrometry was carried through for subunits CTI-I and CTI-II objectifying to determine the accurate molecular masses and probable numbers of isoforms for each subunit. The specters had respectively confirmed microheterogeneity for CTI-I and CTI-II with predominance of the peaks of mass 10,719 and 8,244, respectively.

The impossibility to sequence all spots for each subunit of CTI guided the choice of spots more intense (A and F) to continue the sequence studies. Spots A and F had been submitted to the enzymatic digestions with proteases trypsin, SV8 and clostripain. The accurate mass of the peptide of each digest was determined by mass spectrometry using MALDI-TOF MS. The most intense peptides were been purified and sequenced in a LC connected to the spectrometer of mass ESI QTOF.

The primary structure of CTI, determined from the mass of the peptide of the enzymatic digestions and the sequence gotten for mass spectrometry indicated 182 residues of amino acids, presenting a raised degree of similarity to other Kunitz-type inhibitors of the plant, also with the residue of arginine in the position of the reactive site. The crystallographic structure of CTI inhibitor was solved and reveals that, CTI is composed by two non-covalently bound polypeptide chains and only one disulfide bridge. In spite of these structural differences, CTI is an effective trypsin inhibitor with a dissociation constant of 1.2 nM, a value comparable to other standard Kunitz-type inhibitors like STI, ETI or WCI. Its three-dimensional structure reveals that this is

because the structural discrepancies do not affect the canonical conformation of reactive loop of CTI.

The comparison between the sequence deduced from the experimental electron density maps and the sequence determined using 2D-PAGE, MALDI-TOF and ESI-QTOF mass spectrometry shows an agreement of about 75%, which can be due to the presence of various isoforms that is a common aspect of proteins extracted from seeds. Experiments objectifying the determination of the important amino acid residues in the inhibitory activity of the CTI were performed using specific modifying reagents. The CTI inhibitor was inactivated in 48 and 81% for EDC and PGO, respectively. These composites act in carboxyl group of Asp and Glu (EDC) and residues of arginine (PGO), indicating functionally the importance of the arginine residue in the interaction of inhibitor with protease.

Studies of the conformacional stability in different pHs, temperatures and chaotropic agents have given a wealth of information on the structure and biogenesis of proteins. A study verifying the effect of physico-chemical agents (pH, temperature, DTT, urea and guanidine hydrochloride) in the conformacional stability of trypsin inhibitor (CTI) purified from seeds from *Copaifera langsdorffii* was carried through. CTI an atypical inhibitor of the Kunitz family demonstrated to be resistant in its functional stability, although suffering from damages in the quaternary structure with reduction in 1mM DTT as evidenced for SDS-PAGE, gel filtration in protein-pack, kinetic experiments, spectrum of fluorescence and circular dichroism.

The denaturation experiments in function of the chaotropic agents were monitored by the intensity of the fluorescence of tryptofan residues. The CTI denaturation in the presence of chaotropic agents showed to be a reversible process after dialysis, for structure and function in the case of the urea and guanidine chloride. The results had indicated that the denaturation of CTI involves at least two steps: native and denatured. The presence of 3.5 M of urea or GdnHCl inhibited 50% and 100% of the inhibitory activity, respectively. Both chaotropic agents had promoted a displacement of the mass center. The conformational stability calculations ΔG (H_2O) were made by taking the wavelengths corresponding to the maximum fluorescence emission as a parameter. The ΔG (H_2O) value in function of the concentration of urea and guanidine chloride were 63,0 and 54,0 Kcal mol⁻¹, respectively. The calculations of center of mass were taken as a function of the denaturing agent concentration in both cases.

I. INTRODUÇÃO

65 ANOS DE HISTÓRIA DOS INIBIDORES DE SERINOPROTEASE TIPO KUNITZ

A primeira indicação de um inibidor de protease foi publicada em 1938. Esses pesquisadores observaram que um extrato aquoso de farinha de soja inibia a capacidade da tripsina de dissolver a gelatina. A fração do extrato responsável por esse efeito foi então purificada em 1944. Entretanto, o interesse por essas valiosas moléculas despontou no final da década de 40, iniciado por Kunitz, com um estudo sistemático da caracterização estrutural de um inibidor de tripsina bovina em sementes de soja.

Desde então, muitos inibidores designados por Inibidores de tripsina da família Kunitz têm sido purificados e caracterizados em diversos artigos e em muitas famílias de vegetais. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de determinar um papel biológico para os inibidores naturais de proteases em plantas. As dificuldades na determinação do significado fisiológico dessas proteínas parecem sugerir a possibilidade dos inibidores exercerem uma multiplicidade de papéis.

Outras pesquisas têm buscado, nos mais diversos campos, aplicações para estas moléculas biológicas que podem inibir uma diversidade de proteases com especificidade e constante de inibição variadas. Embora a literatura sobre as propriedades dos inibidores de enzimas proteolíticas seja ampla, esta introdução demonstra a necessidade de uma revisão sobre os aspectos funcionais, estruturais, conformacionais e evolutivos, revelando o potencial de aplicação em campos diversos e propondo uma questão interessante. Por que essas moléculas semelhantes estruturalmente entre si funcionam diferentemente do ponto de vista biológico? É de interesse ampliar as possibilidades de aproveitá-las da melhor forma possível como ferramentas na investigação dos mecanismos catalíticos de muitas enzimas, como aquelas envolvidas em processo digestivo, coagulação sanguínea e na carcinogênese.

PROTEASES E SEUS INIBIDORES

As enzimas proteolíticas ou proteases constituem um grupo altamente especializado de proteínas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas específicas, participando da regulação de diferentes processos essenciais nos organismos como: a coagulação sanguínea; a fibrinólise; processamento de maturação hormonal; fertilização; fagocitose; germinação; digestão proteolítica; processos tumorais e inflamatórios (DeClerck & Imren, 1994; Neurath, 1993; Kennedy, 1998; Schmaier, 2000; Bode & Huber, 2000).

As proteases são classificadas de acordo com a sua especificidade, ou seja, frente às diferenças dos sítios catalíticos em serínicas, aspárticas, cisteínicas e metaloproteinases. As serinoproteases representam a principal família, caracterizada pela presença de um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de aminoácido serina (Richardson, 1977; Neurath, 1993, Laskowski & Cassim, 2000).

Nessa família estão incluídas enzimas de procariontes e eucariontes (quimotripsina, tripsina, subtilisina e elastase), importantes na digestão, na coagulação sanguínea, nos processos inflamatórios e no desenvolvimento celular. A tripsina, uma das serinoproteases digestivas mais conhecida, catalisa a hidrólise de ligações peptídicas, sendo específica para dois resíduos carregados positivamente (arginina e lisina). Em adicional à serina reativa, também se observa a presença de uma histidina cataliticamente essencial e um resíduo de ácido aspártico (Figura 01). Esses três resíduos altamente conservados, chamados de tríade catalítica, são importantes para formação da estrutura secundária através de interações por pontes de hidrogênio (Laskowski & Cassim, 2000).

As proteases devem ser reguladas para prevenir digestão ao acaso de proteínas intracelulares. Os dois principais métodos de regulação de protease são a ativação de zimogênio e a interação protease-inibidor. No último caso, os inibidores associam-se com as enzimas, de acordo com o mecanismo padrão, onde a enzima reage com a molécula do inibidor como se fosse o próprio substrato. Devido à ampla versatilidade e grande participação das proteases sobre diversos processos metabólicos, observa-se um aumento no interesse em compreender melhor as estruturas dessas enzimas e dos mecanismos de controle das mesmas, incluindo os inibidores naturais e artificiais de proteases, os quais são capazes de modular as atividades dessas proteínas (Bode & Huber, 2000; Laskowski & Cassim, 2000).

Os inibidores são classificados de acordo com a sua especificidade frente as diferentes classes mecanísticas de enzimas proteolíticas (serínicas, aspárticas, cisteínicas e metaloproteinases) por eles inibidas (Laskowski Jr. & Kato, 1980). Os inibidores de serinoproteases têm sido classificados em famílias, de acordo com a sua homologia na estrutura primária; localização e número das pontes dissulfeto; posição do sítio reativo e pela massa molecular, de tal forma que os inibidores pertencentes à mesma família são relacionados evolutivamente. São conhecidas várias famílias de inibidores de serinoproteases em plantas, sendo as mais importantes as dos inibidores da família Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II e os inibidores da família Squash. Diversos artigos têm evidenciado uma ampla aplicabilidade para os inibidores, principalmente para aqueles da família Kunitz (Richardson, 1991; Ryan, 1990).

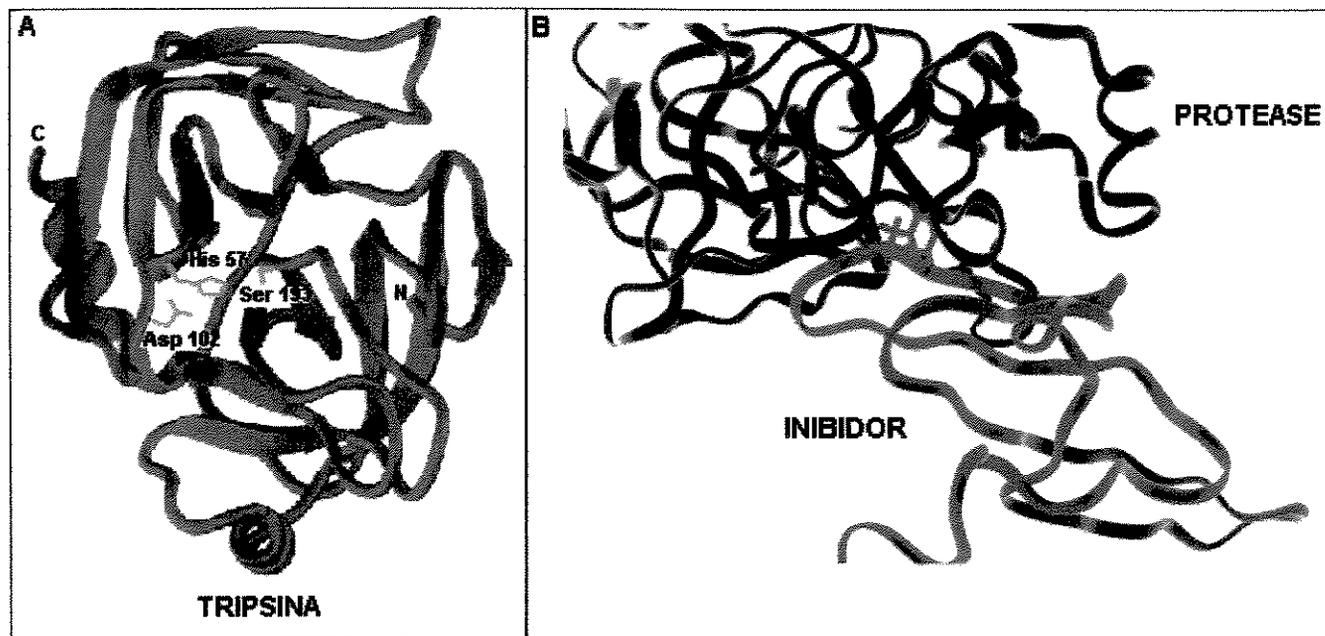


Figura 01 – A) Estrutura da serinoprotease Tripsina Bovina, evidenciando o sítio catalítico constituído por His, Ser e Asp. B) Estrutura do complexo Inibidor – Protease (Voet et al., 2000).

INIBIDORES DE KUNITZ

A primeira indicação de um inibidor de protease foi publicada em 1938 com a observação de que o extrato aquoso de farinha de soja inibia a capacidade da tripsina de dissolver a gelatina (Read & Haas, 1938). A fração do extrato responsável por esse efeito inibitório, foi então purificada por Ham et al. (1945) e Bowman (1946).

O interesse por essas valiosas moléculas despontou no final da década de 40, quando Kunitz (1945) isolou e purificou uma proteína termo-lábil de soja que inibia a tripsina. Um passo significativo foi dado em 1947 com um estudo sistemático de caracterização estrutural de um inibidor de tripsina purificado em sementes de soja (Kunitz, 1947). *A priori*, o interesse pelos inibidores de origem vegetal foi motivado pelo seu provável significado nutricional. A presença desta proteína, não desnaturada adequadamente em sementes de legumes e em grãos de cereais contribui demasiadamente para diminuir o valor nutricional de derivados destas sementes.

Estudos relatam que alimentação a base de soja crua ou produtos derivados de leguminosas que contém altos níveis de inibidores de proteases, quando testados em animais experimentais (ratos e pintos) conduz ao aumento de depressão, hipertrofia e/ou hiperplasia pancreática, bem como decréscimo na taxa de crescimento (Richardson, 1991; Birk & Apfleubam, 1994; Liener, 1996; Pisulewska & Pisulewski, 2000).

OCORRÊNCIA NOS VEGETAIS

Os inibidores de Kunitz são de ocorrência muito ampla entre os vegetais. Entre as dicotiledôneas, as famílias Leguminosae e Solanaceae englobam o maior número de espécies contendo esses inibidores. Nas monocotiledôneas eles são mais amplamente distribuídos entre as Poaceae (Gramíneas). Ocorrem predominantemente em sementes, porém não estão restritos apenas a essa fonte, pois, já foram encontrados em tubérculos de batatas, folhas, frutos e em alguns cereais.

Apesar de sua ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores presentes nas diversas espécies é extremamente variável, mesmo entre espécies do mesmo gênero e até

entre variedades de uma mesma espécie (Valueva, et al., 2000; Ryan, 1990; Richardson, 1991; Taschiro et al., 1987; Ohtsubo & Richardson, 1992).

As sementes, em especial das leguminosas, apresentam altas concentrações de inibidores, cujo papel fisiológico tem sido objeto de muita especulação. Entre as leguminosas, os inibidores da família Kunitz têm sido relatados nas três subfamílias. Nas Papilonoideae eles foram observados principalmente em *Glycine max* (soja), *Psophocarpus tetragranulobus*, *Erythrina latissima*, *E. caffra*, *E. variegata*, *Crotalaria paulinia* entre outras (Koide & Ikenaka, 1973; Koide et al., 1973; Shibata et al., 1986; Joubert & Sharon, 1985; Kouzuma et al., 1997; Pando et al., 1999).

Nas Mimosoideae, os inibidores de Kunitz têm sido relatados em *Adenathera pavonica*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia confusa*, *Prosopis juliflora*, *Dimorphandra mollis* entre outras (Richardson, 1986; Batista et al., 1996; Wu & Lin, 1993; Monte-Negreiros et al., 1991; Macedo et al., 2002a; Mello et al., 2001). Nas Caesalpinoideae, os inibidores de Kunitz têm sido observados na maioria das espécies do gênero *Bauhinia* (*B. petandra*, *B. bauhinoides*, *B. variegata*, *B. rufa*, *B. fortificata*, *B. unguolata*), entre outras espécies de outros gêneros (*Peltophorum africanum*, *P. dubium*, *Schizolobium parahyba*, *Copaifera landsdorffii*, *Delonix regia*, *Swartzia pickellii*) (Oliva et al., 1996; Di Ciero et al., 1998; Joubert, 1981; Troncoso et al., 2003; Souza et al., 1995; Silva et al., 2001; Pando et al., 2001; Cavalcanti et al., 2002).

ASPECTOS ESTRUTURAIS

Pontes Dissulfeto

O primeiro inibidor do tipo Kunitz, de origem vegetal, a ter sua estrutura primária estabelecida foi aquele isolado de sementes de soja designado por SBTI (Ikenaka et al., 1974). Após três décadas de estudos, a literatura recente aos poucos vem demonstrando através do uso de técnicas modernas, que essas moléculas apresentam uma enorme diversidade estrutural que implica na multiplicação das suas prováveis funções biológicas e aplicações em diversos campos.

Uma das principais características dos inibidores de Kunitz diz respeito à presença de resíduos de cisteínas estabelecendo pontes dissulfeto, que estabilizam regiões moleculares mantendo a conformação responsável pela atividade inibitória. Na maioria desses inibidores há quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto, independentemente da subfamília de leguminosa da qual foram purificados e caracterizados (Ryan, 1990; Richardson, 1991).

Os inibidores de Kunitz purificados das sementes de Papilonoideae e Mimosoideae apresentam no máximo quatro resíduos de cisteína, que podem formar uma ou duas pontes dissulfeto estabilizando a sua estrutura (Ryan, 1990; Richardson, 1991; Batista et al., 1996).

Ao que tudo indica, os inibidores observados na subfamília Caesalpinoideae das leguminosas parecem ser anômalos em relação à presença e quantidade das pontes dissulfeto em sua estrutura. Inibidores purificados e caracterizados de sementes de *Bauhinia rufa* (BrTIs) e *Bauhinia bauhinioides* demonstraram ser ausentes de resíduos de cisteínas a partir da seqüência primária e análise por espectrometria de massa.

Cavalcanti et al. (2002) purificaram um inibidor de tripsina (SWTI) em sementes de *Swartzia pichellii* que apresentava somente uma ponte dissulfeto. Recentemente, também têm sido descrito inibidores do tipo Kunitz (em batata) ausente da segunda ponte dissulfeto, mas efetivamente funcional para seus sítios (Valueva et al., 2000).

Sítio Reativo

O sítio reativo na maioria dos representantes da família Kunitz localiza-se na posição homóloga à do clássico inibidor de soja, apresentando resíduos básicos na posição P1 (Arg⁶³ – Ile⁶⁴). Em geral, este sítio é a região da molécula que define a sua especificidade e encontra-se em uma alça estabilizada por uma ponte dissulfeto e por um conjunto de interações fracas do tipo ponte de hidrogênio, conferindo ao inibidor uma conformação canônica apropriada para a sua melhor interação com a enzima alvo.

Entretanto, os inibidores isolados recentemente da subfamília Caesalpinoideae têm evidenciado resíduos de aminoácidos diferentes daqueles observados para o SBTI. Pando et al. (2001) demonstraram a presença de ácido glutâmico e serina para o inibidor de *Delonix regia*, enquanto, Cavalcanti et al. (2002) identificaram um resíduo de glutamina na posição da Arg⁶³. O inibidor de *Acacia confusa* da subfamília Mimosoideae mostrou-se diferente por apresentar os resíduos de Arg⁶⁴ – Ile⁶⁵ no seu sítio reativo (Wu & Lin, 1993). Estas diferenças

nos resíduos de aminoácidos corroboram para o melhor entendimento do mecanismo e força de interação entre estas moléculas e as proteases.

Estrutura Primária e Tridimensional

A realização de estudos da estrutura primária de proteínas isoladas de diversas famílias de plantas tem permitido estabelecer domínios com significativo grau de homologia entre estas e os clássicos inibidores de tripsina do tipo Kunitz. Os inibidores isolados e caracterizados em grãos de cereais (trigo, arroz e cevada) exibem um grau de homologia (20-30%) com os clássicos inibidores do tipo Kunitz, mas inibem preferencialmente outras serinoproteases que não a tripsina (subtilisina, catepsina-D), entre outras enzimas como α -amilase em sítios distintos.

Assim, temos os inibidores de cevada (Hejgaard et al., 1994; Svendsen et al., 1986), trigo (Maeda, 1986) e arroz (Ohtsubo & Richardson 1992), que foram denominados bifuncionais devido à capacidade de inibir subtilisina e α -amilase. Do mesmo modo, certos inibidores de subtilisina purificados das sementes de *Canavalia lineata* foram classificados como inibidores do tipo Kunitz, devido à homologia da estrutura primária, apesar da presença incomum de cinco resíduos de meia cistina e um resíduo único de cisteína (Terada et al., 1994).

Sob o ponto de vista da estrutura tridimensional, o inibidor de tripsina da família Kunitz melhor caracterizado até o momento foi aquele purificado de sementes de *Erythrina caffra*, pois este tem sido objeto de inúmeros estudos através dos quais foi determinada a sua estrutura cristalográfica. O estudo da estrutura tridimensional do inibidor de *E. caffra* revelou a presença de 12 fitas antiparalelas, das quais, aparentemente 6 formam uma estrutura semelhante a um barril, e as 6 fitas restantes constituem uma tampa (Song & Suh, 1998).

Além disso, foi verificada a existência de algumas alças na molécula e uma delas engloba a região do sítio reativo. Esta estrutura é semelhante à interleucina-1 β , proteína que atua em processos inflamatórios, porém, não apresenta atividade inibitória (Finzel et al., 1989; Heussen-Schenner et al., 1991; Onesti et al., 1990).

A análise cristalográfica da estrutura do complexo formado pelo inibidor tipo Kunitz e a protease fornecem bases para estudos de modelagem sobre o modo de interação entre inibidores homólogos e proteases, como foi revelada nos estudos de interação entre um

inibidor homólogo de *Erythrina caffra* (ETI) ativador de plasminogênio. Esses dados têm demonstrado que o complexo (enzima-inibidor) é um excelente modelo de investigação dos princípios bioquímicos e biofísicos fundamentais da interação proteína-proteína (Song & Suh, 1998; Yang et al., 1996).

Quando se analisou o complexo SBTI-tripsina suína, obtido através de cristalografia, foi verificado que, além do resíduo P1, aquele normalmente básico e que define a especificidade e afinidade inibidor-protease, os resíduos P3, P2, P1' e P2' são muito importantes para a interação enzima-inibidor (Joubert et al., 1987). Em geral, as regiões próximas à extremidade N-terminal dos inibidores são muito conservadas e apresentam alto grau de homologia. O "docking", ou seja, a sobreposição das estruturas tridimensionais, tem permitido inferir as regiões de contato entre as estruturas protéicas associadas, como as enzimas e seus inibidores.

Destes estudos tem emergido a hipótese de que o resíduo Asn₁₄ é essencial para a atividade inibitória, pois, promove a formação de três pontes de hidrogênio com os resíduos Thr₁₄₉, Tyr₁₅₁ e Glu₁₉₂ da molécula de tripsina. Este fato evidencia a importância da região N-terminal da molécula dos inibidores na interação com a tripsina, como observado por Ravichandran et al. (2001).

Os inibidores de Kunitz foram inicialmente caracterizados como cadeia polipeptídica única com massa molecular de aproximadamente 20kDa, correspondendo a cerca de 180 resíduos de aminoácidos. Há muito tempo, aceita-se que aqueles inibidores de massa molecular relativamente alta em gel de eletroforese e cromatografia de exclusão, apresentam-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular relativa de aproximadamente 20kDa (Richardson, 1991; Lehle et al., 1996).

Os inibidores de Kunitz purificados e caracterizados em sementes da subfamília Mimosoideae da família Leguminosae e aqueles purificados de batatas da família Solanaceae são normalmente detectados como heterodímeros, que apresentam duas pontes dissulfeto estabilizando a sua estrutura composta por duas cadeias, uma cadeia maior de 16kDa e uma menor de 5kDa (Batista et al., 1996; Bode & Huber, 1992). Segundo Richardson (1991) essas duas cadeias resultam de um processamento proteolítico de um precursor de cadeia única, mas as causas que determinam esta clivagem unicamente nas

espécies da subfamília Mimosoideae e em alguns representantes da família Solanaceae são ainda desconhecidas.

Isoformas e Isoinibidores

A presença de isoformas para os inibidores de Kunitz tem sido amplamente divulgada, sendo a origem e o papel fisiológico em plantas pontos ainda não esclarecidos. Wilson & Chen (1983) mostraram que as isoformas resultam do processamento proteolítico pós-traducional da região N e C-Terminal.

Mosolov (1995) isolou três isoformas reativas para tripsina em sementes da leguminosa *Gleditsia triacanthos* que revelaram ter alto grau de homologia em suas estruturas primárias e completa similaridade em suas propriedades estruturais e funcionais. Di Ciero et al. (1998) isolaram um inibidor do gênero *Bauhinia*, da subfamília Caesalpinoideae que demonstrou a presença de três isoformas em focalização isoelétrica.

Alguns métodos, como a espectrometria de massas, determinação da seqüência N-terminal, eletroforese bidimensional e técnicas em biologia molecular, vêm sendo amplamente exploradas com o propósito de caracterizar e determinar a função biológica para as isoformas presentes em sementes. Não muito raro, vários autores têm isolado e caracterizado mais de um inibidor em uma única semente, os quais podem ser designados por isoinibidores.

Em Solanaceae, foram detectados três isoinibidores com 21, 22 e 23 kDa que apresentaram homologia na seqüência N-terminal com outros inibidores de Kunitz, porém diferindo em número de subunidades e especificidade inibitória. O inibidor de 21kDa apresentou dupla cadeia polipeptídica, que lhe permitia atuar efetivamente sobre a elastase de leucócitos humanos e tripsina. Os inibidores de 22 e 23kDa apresentaram uma única subunidade e especificidade inibitória para tripsina e proteases cisteínicas tipo papaína e bromelaína (Valueva et al., 1997).

ASPECTOS FUNCIONAIS

Os inibidores são moléculas protéicas capazes de se associarem à proteases, formando complexos estequiométricos, e inibindo competitivamente todas as funções catalíticas das enzimas. A região do inibidor que entra em contato com a protease é designada por sítio reativo, a qual compreende uma pequena seqüência de resíduos de aminoácidos em um domínio formado a partir de uma ponte dissulfeto, característica de todos os inibidores de Kunitz.

O contato entre estas moléculas se dá através de numerosas interações resultando em um ajuste excelente. A determinação das constantes de inibição tem sido uma das formas possíveis para estudar os meios de interação entre os inibidores e suas enzimas alvos (Laskowski & Kato, 1980). A especificidade parece ser uma característica marcante no estudo das interações entre enzimas e inibidor. Ela é determinada pela termodinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima (Bode & Huber, 1992). Vale lembrar, que no universo da proteína nada é regra, e muitos inibidores de Kunitz são multifuncionais.

Assim, o inibidor de milho é capaz de inibir tanto tripsina quanto alfa-amilase. Os inibidores de batatas inibem as serinoproteases e as cisteinoproteases (Papaína, Catepsina D) e outras proteínas com homologia significativa para o inibidor de Kunitz, como por exemplo: albuminas; esporamina de batata-doce e miracolina de *Richardella dulcifica* não apresentam atividade inibitória. Há ainda, os inibidores bifuncionais que são capazes de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo, os inibidores de arroz e cevada apresentam inibição para alfa-amilase e subtilisina. Outros ainda inibem elastase, trombina, plasmina e calicreína (Oliva et al., 2001).

Os inibidores compostos por duas cadeias polipeptídicas se diferenciam do clássico SBTI por apresentarem mais de um sítio reativo para proteases, evidenciando uma constante de inibição relativamente baixa (10^{-12}M). Os inibidores isolados e caracterizados em sementes de *Albizzia julibrissin*, da subfamília Mimosoideae, mostraram-se capazes de inibir tripsina e quimotripsina em um dos sítios e elastase e quimotripsina no outro sítio reativo (Odani et al., 1979).

Alguns inibidores de Kunitz da subfamília Mimosoideae parecem exercer atividade tanto sobre serinoprotease quanto sobre cisteinoprotease, aparentemente no mesmo sítio

reativo, como tem sido observado para o inibidor de Kunitz de sementes de *Prosopis juliflora*, sendo incapaz de inibir tripsina e papaína simultaneamente (Franco et al., 2002; Oliveira et al., 2002).

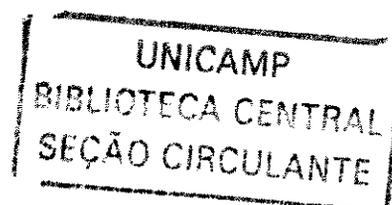
Domínio de Ligação a Carboidrato

Um ponto sobre o aspecto estrutural e funcional dos inibidores de Kunitz tem despertado muita atenção dos pesquisadores recentemente, sendo este a presença de um possível domínio de reconhecimento para carboidrato, ocorrendo a caracterização de inibidores na forma glicosilada. Três formas de SWTI da subfamília Caesalpinoideae foram atualmente definidas com o auxílio de espectrometria de massa, sendo duas formas glicosiladas de aproximadamente 20.200kDa e uma deglicosilada de 19.016, contendo resíduos de metionina na posição 130 (Cavalcanti et al., 2002).

Paiva et al. (2003) e Troncoso et al. (2003) evidenciaram a presença de domínios nestes inibidores que são específicos para o reconhecimento de carboidratos. A confirmação destas características despontou a partir da publicação de um novo inibidor de tripsina em sementes de *Peltophorum dubium*, que apresentou propriedades de lectinas-like. A presença de um domínio nos inibidores do tipo Kunitz, capaz de interagir com carboidratos foi confirmada a partir de estudos de Macedo et al. (2002a) que indicaram a interação do inibidor de tripsina de *Dimorphandra mollis* com quitina.

Essa hipótese ganhou reforço com o artigo de Paiva et al. (2003) que usaram cromatografia de afinidade com isolectinas de *Cratylia mollis* imobilizadas para purificar inibidores de tripsina em sementes de *Echinodorus paniculatus*. Esses autores ainda confirmaram que a atividade inibitória para tripsina mostrava-se dependente da ligação do carboidrato ao domínio de reconhecimento.

Tais descobertas podem vir a explicar diversas funções, até então, pouco esclarecida para os inibidores de tripsina em sementes. Por último, salientamos que um inibidor de *Dimorphandra mollis* mostrou ser eficaz em inibir o desenvolvimento do Gorgulho *Callosobruchus maculatus* e que o mesmo apresentou alta afinidade por ligar na resina de quitina (Macedo et al., 2002a).



ESTABILIDADE E ASPECTOS CONFORMACIONAIS

A maioria das proteínas pequenas pode ser reversivelmente desenhovelada elevando-se a temperatura, ou pela adição de um agente desnaturante como uréia ou cloreto de guanidina. Diferentes indicadores da conformação protéica evidenciam que pelo menos dois estados conformacionais estão presentes em quantidades apreciáveis nas proteínas: um estado nativo e um estado desenhovelado, que se encontram em rápido equilíbrio. Contudo, as proteínas exibem um estado adicional sob certas condições de desnaturação denominado de estado de glóbulo amorfo ou fundido, onde se destaca a natureza flutuante das interações de unidades da estrutura secundária. De fato, o glóbulo amorfo é um intermediário prontamente observável entre as formas nativa e a desenhoveladas de muitas proteínas (Hammarstrom et al., 2001; Jaenicke, 1999).

Uma das principais características dos inibidores de Kunitz diz respeito à presença de resíduos de cisteínas estabelecendo pontes dissulfeto, que exercem a função teórica de estabilizar a conformação canônica responsável pela atividade inibitória. A presença de pontes dissulfeto parece ser de suma importância na projeção de resíduos críticos do sítio reativo destes inibidores que irão interagir com as proteases.

Muito ainda precisa ser esclarecido sobre o real papel destes resíduos na estrutura e atividade dos inibidores. Ramasarma et al. (1995) observaram que os inibidores de Bowman-Birk são altamente resistentes a agentes desnaturantes. Porém, sua estrutura nativa e funcional é decisivamente prejudicada na presença do agente redutor DTT, sugerindo que a redução das pontes dissulfeto promove uma desestabilização significativa da estrutura terciária sem afetar consideravelmente a estrutura secundária.

Dois trabalhos detalhando a estabilidade conformacional dos inibidores têm demonstrado resultados interessantes. Grinberg et al. (2000) discutiram a desnaturação térmica e a contribuição das ligações de hidrogênio na estabilização do estado nativo de um inibidor de tripsina do tipo Kunitz (KTI), encontrado em sementes de soja, utilizando o método de calorimetria diferencial de alta sensibilidade (HS-DSC do inglês: *High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry*). No mesmo ano De Souza et al. (2000) observaram os efeitos de agentes desnaturantes na atividade inibitória e na estabilidade conformacional do inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizolobium parahyba* da subfamília Caesalpinoideae.

Lehle et al. (1996) evidenciaram, através de mutação sítio-dirigida, expressão, purificação e caracterização físico-química do inibidor de Kunitz recombinante de *Erythrina caffra*, que as pontes dissulfeto retém a estrutura nativa da molécula de inibidor, sem ser tão importante para a atividade inibitória. Minuth et al. (1998) observaram que o inibidor recombinante de tripsina de *E. caffra* (recSerETI), com resíduo N-terminal valina substituído por serina, apresentava propriedades estruturais e funcionais muito semelhantes às do inibidor não recombinado, observando, contudo, uma diminuição da estabilidade conformacional frente ao desenovelamento térmico e ao agente desnaturante GdnHCl.

ASPECTOS EVOLUTIVOS

Com o objetivo de esclarecer os processos evolutivos, estudos de homologia seqüenciais da estrutura primária dos inibidores de diferentes espécies têm sido utilizados (Figura 02). As relações filogenéticas entre inibidores são de interesse para vários grupos de pesquisadores. Um conhecimento adequado dessas relações no caso dos inibidores de Kunitz, encontrados em sementes de plantas de leguminosas esclareceria e/ou reforçaria posições sistemáticas estabelecidas tendo como base caracteres morfológicos.

As leguminosas (Fabaceae) são classificadas morfológicamente, em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilonoideae, sendo as Mimosoideae as mais primitivas, Papilonoideae as mais evoluídas e as Caesalpinoideae pertencentes a um estágio intermediário de evolução (Cronquist, 1988). Na Figura 02 nota-se uma relação entre o aspecto funcional-estrutural dos inibidores de Kunitz e os grupos taxonômicos de plantas (Mukhopadhyay, 2000).

De acordo com pesquisas realizadas sobre a estrutura dos inibidores, Norioka et al. (1988) estabeleceram uma teoria detalhando a evolução nas Leguminosas. Os representantes da Subfamília Caesalpinoideae são normalmente caracterizados por apresentar, com algumas exceções, inibidores da família Kunitz, que normalmente são de cadeia polipeptídica única. Nas Mimosoideae encontram-se inibidores do tipo Kunitz sendo estes normalmente poliméricos (Batista et al., 1996).

Esse fato sugere que há alguma relação entre os inibidores encontrados em sementes de leguminosas e a evolução da plantas. Segundo Norioka et al. (1988), as

leguminosas primitivas inicialmente apresentavam apenas inibidor da família Kunitz de cadeia única e, ao longo da evolução de árvores para arbustos, adquiriram inibidores do tipo Kunitz de cadeia polimérica e aqueles de outra família, à medida que se adaptavam ao ambiente.

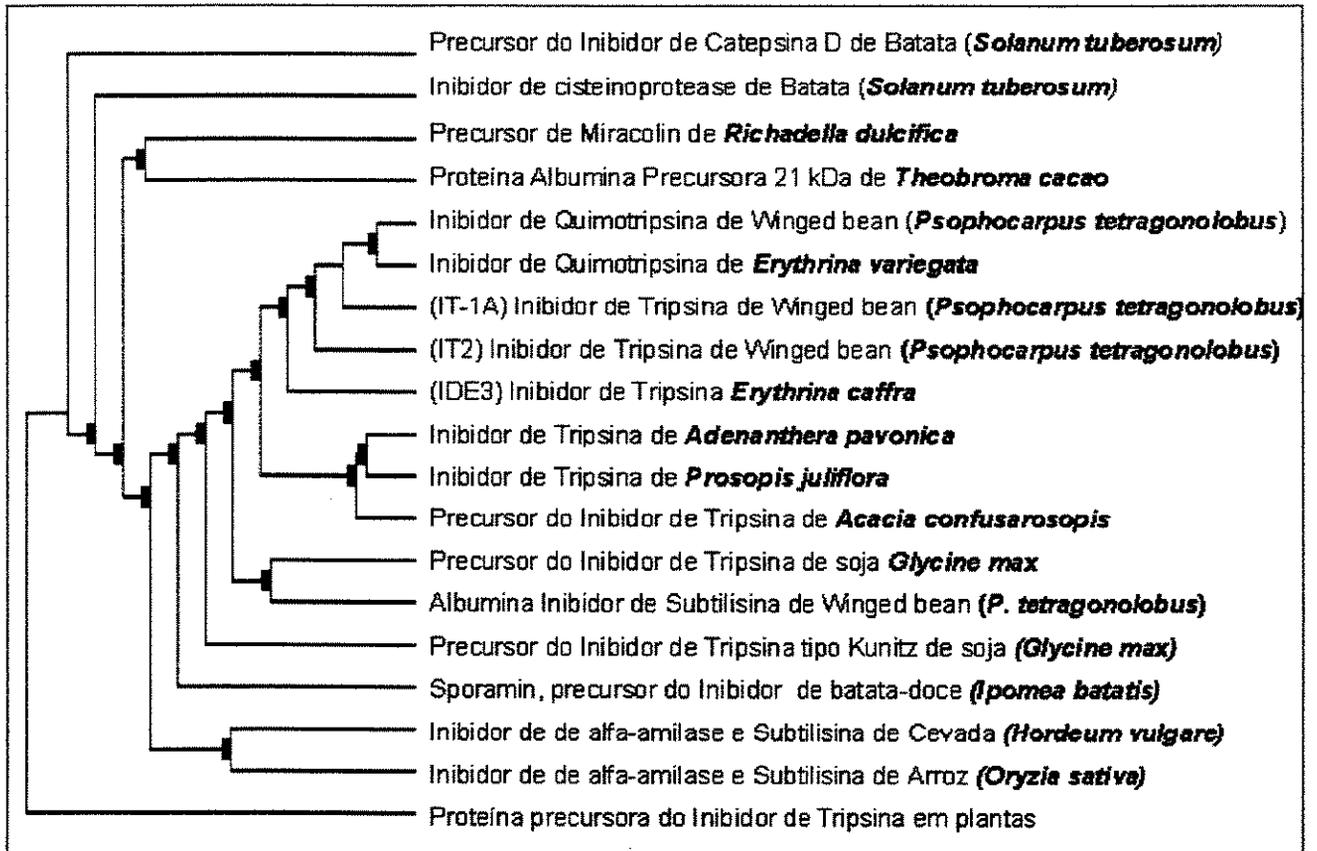


Figura 02 – Possível árvore filogenética dos inibidores do tipo Kunitz observados em sementes (Adaptado de Mukhopadhyay, 2000).

FUNÇÕES BIOLÓGICAS & APLICABILIDADES

A presença dos inibidores em plantas, há muito tempo, tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. O interesse observado foi inicialmente baseado na aceitação de que os inibidores de proteinases são parcialmente responsáveis pelo baixo valor nutritivo dos alimentos, frutos e sementes que apresentam tais substâncias.

As demais pesquisas sobre os inibidores deram origem a vários artigos, abordando a sua distribuição, propriedades físicas e químicas, biossíntese e degradação na planta, bem como seus efeitos nutricionais em animais. Parte significativa dessas investigações, não obstante os diferentes enfoques convergem para o mesmo objetivo – o de esclarecer o significado fisiológico da ocorrência e da ampla distribuição dessas moléculas entre os seres vivos (Silva et al., 2001).

As dificuldades na determinação do significado fisiológico dessas proteínas parecem sugerir a possibilidade dos inibidores exercerem uma multiplicidade de papéis. Entre as funções biológicas propostas para os inibidores, incluem o envolvimento nos processos de regulação de proteases endógenas, atuação como proteínas de reserva entre outras (Richardson, 1991).

Uma das funções mais atrativas dos inibidores é a atuação no mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de patógenos e herbívoros. Dados relatando possíveis papéis, antifúngico e antimicrobiano para os inibidores de tripsina, vêm sendo cada vez mais detalhados (Lorito et al., 1994). O levantamento de mais particularidades funcionais e estruturais sobre os inibidores de Kunitz, muito contribuirá na construção de substratos sintéticos baseados nessas moléculas de origem vegetal, para o estudo cinético e funcional de proteases envolvidas em processos biológicos vitais.

Estudos recentes sugerem que os inibidores de proteases atuam como agentes anticarcinogênicos, prevenindo e suprimindo tumores cancerígenos no cólon, na mama e em próstata. A associação de sementes ricas em inibidores de proteases com a prevenção de câncer humano vêm estimulando a discussão da possível ação dos inibidores como agentes quimopreventivos para o câncer (Kennedy, 1998; Ohba et al., 1998).

PERDAS NA PRODUÇÃO DE GRÃOS

A população mundial tem expandido assustadoramente durante as últimas décadas e um desafio emerge com a necessidade de aumentar a produção da agricultura mundial para satisfazer a demanda progressiva da população. A situação fica ainda mais complicada ao considerar que 60% da população mundial tem toda sua alimentação concentrada em quatro produtos básicos: trigo, milho, arroz e feijão.

Nos países em desenvolvimento, a carência de proteínas de origem animal apresenta-se como o pivô motivador de pesquisas sobre a natureza de proteínas vegetais. Com o crescimento desenfreado da população mundial, será necessário multiplicar o suprimento de proteínas, principalmente, aquelas de origem vegetal, que passam a desempenhar um papel de grande importância como fonte de aminoácidos (Hilder & Boulter, 1999).

Em muitos países em desenvolvimento, inclusive o Brasil, as proteínas de plantas já constituem a principal fonte de aminoácidos na dieta de populações menos favorecidas, onde variedades de feijão (*Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*) são os grãos que representam uma grande parte da fonte protéica na alimentação humana e de animais (Duranti & Gius, 1997).

Uma grande parte da produção destes grãos é perdida durante o armazenamento por causa de danos ocasionados por diversas pragas, principalmente por insetos designados por Caruncho ou Gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) que representam a principal praga durante o armazenamento destes feijões (Macedo et al., 2002a; 2002b). Em períodos severos de infestação, a perda destes feijões armazenados após colheita, pode atingir até 100% em seis meses, devido ao ataque do bruquídeo (Hall et al., 1997).

MECANISMO DE DEFESA DE PLANTAS

Diferente dos animais, as plantas não possuem um sistema imunológico para a sua defesa contra microrganismos e demais pestes patogênicas. Entretanto, devido a sua imobilidade absoluta, as plantas não podem evitar ou escapar do ataque destas pragas. Assim, elas têm realmente um outro sistema de defesa o qual puderam desenvolver no curso de sua evolução.

As plantas apresentam um arsenal de defesa contra ataques de insetos e microrganismos, dentre estes, as proteínas são consideradas armas poderosas, e cresce progressivamente o número de artigos que investigam o papel das proteínas de reserva (lectinas, inibidores de proteases) no mecanismo de defesa de plantas (Oliveira et al., 2002; Macedo et al., 2002a; 2002b). No acirrado combate estabelecido entre vegetais, insetos e microrganismos causadores de doenças, os inibidores de proteases são considerados uma

arma eficaz, constitutivamente expressa pelos vegetais, para antecipar um ataque por patógenos e predadores.

Em plantas, os inibidores de proteases atuam, aparentemente, em duas direções, regulando a atividade de proteases endógenas e suprimindo a atividade de proteases exógenas de patógenos e herbívoros predadores. A hipótese de que os inibidores estão envolvidos no mecanismo de defesa contra insetos foi primeiramente sugestionada por Green & Ryan (1972).

Dois artigos recentes de Oliveira et al. (2002) e Macedo et al. (2002a), voltaram a discutir este assunto polêmico iniciado na década de oitenta e cercado de vários conflitos e interesses sobre o papel dos inibidores de tripsina de sementes no mecanismo de defesa de plantas. Gatehouse (1979) sugeriu que a resistência em cultivar de feijão-de-corda (TVu 2027) ao ataque do gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) era devido à alta concentração de inibidores de serinoproteases. Essa hipótese recebeu expressivo reforço quando Ryan (1981) conseguiu isolar um polipeptídeo sinalizador denominado por fator indutor de inibidor de protease (PIIF), liberado no local do ferimento.

Esse fator é altamente ativo e capaz de desencadear a reação de estresse em folhas de várias plantas (tomateiro, batata e tabaco), acumulando inibidores de proteases que atuam contra as injúrias provocadas pelo ataque de insetos. Os desencontros na literatura iniciam quando Xavier-Filho et al (1989) deflagram, a partir de um minucioso estudo, comparando três cultivares resistentes com três cultivares suscetíveis quanto aos níveis de inibidores e performance do Gorgulho nas sementes.

Neste estudo sugere-se que nenhum dos inibidores estudados (de tripsina, de quimotripsina, de subtilisina e de papaína) seriam responsáveis pela tal resistência observada para o cultivar de feijão-de-corda (TVu 2027), uma vez que, os cultivares suscetíveis apresentaram teor comparável de inibidores. Estes resultados não descartaram a possibilidade de que os inibidores desempenhariam um papel de proteção, mas indicaram que no desenvolvimento da resistência ao ataque dos insetos em questão, fatores outros que não apenas os inibidores estariam relacionados (Xavier-Filho et al., 1996).

Os inibidores de Kunitz têm sido largamente administrados em dietas artificiais inibindo o desenvolvimento e crescimento de larvas de insetos de Leptodopteras e Coleopteros (Figura 03). Vários artigos demonstraram a atividade inibitória *in vitro* das proteases observadas em diferentes classes de insetos. É provável que o mecanismo de

ação dos inibidores ocorra através de uma inibição competitiva, bloqueando parcialmente a proteólise.

A ingestão desses inibidores não eliminaria por completo a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos. Tem-se na verdade, uma hiperprodução desordenada de proteases digestivas para compensar o efeito da inibição, ocasionado à deficiência de aminoácidos na síntese de outras proteínas, afetando assim o crescimento e o desenvolvimento larval destes insetos (Broadway & Duffey, 1988; Markwick et al., 1995; Ceciliane et al., 1998; Gatehouse et al., 1993; Johnson et al., 1995; Shewry & Lucas, 1997).

Muitos insetos que se alimentam de sementes, como por exemplo, aqueles da família Bruquideae dos Coleopteras utilizam principalmente proteases cisteínicas e aspárticas na digestão das proteínas, desta forma, muitos pesquisadores têm demonstrado especificamente neste grupo de insetos, que os inibidores de tripsina tipo Kunitz não poderiam apresentar um papel na defesa de vegetais contra os Coleopteras (Xavier-Filho & Coelho, 1980; Gatehouse et al., 1985; Kitich & Murdick, 1987).

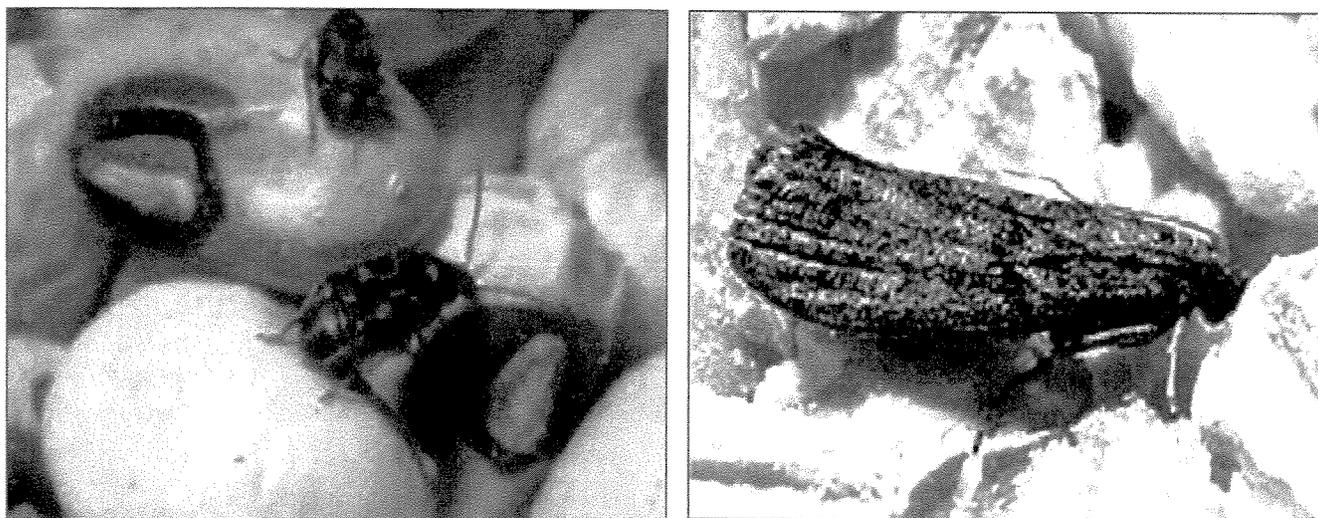


Figura 03 – Exemplos de algumas pragas economicamente importantes. À esquerda observa-se o Gorgulho *Callosobruchus maculatus* e à direita tem-se o inseto Lepdotptero *Anagasta Kuehniella*.

As pragas encontraram diversas maneiras de evitar os efeitos negativos dessas proteínas de defesa em suas plantas hospedeiras como o uso de proteases para as quais a planta não tem inibidores, a degradação proteolítica dos inibidores e a ocorrência de mutações, conferindo às proteases dos insetos maior resistência, sem a perda da sua atividade catalítica (Jongsma & Bolter, 1997).

Embora muitos pesquisadores estejam investigando os efeitos desses inibidores como um mecanismo de defesa de plantas, muito ainda precisa ser esclarecido. Primeiro, os inibidores de proteases encontrados em sementes são efetivos *in vitro* contra algumas das enzimas digestivas encontradas no trato intestinal de insetos (Ceciliani et al., 1997) ou como dieta artificial (Oliveira et al., 2002; Macedo et al., 2002a), mas ainda falta ser demonstrado se estes inibidores servem como defesa das sementes *in vivo*.

Segundo, a eficácia destes inibidores depende da compatibilidade estrutural do inibidor com a protease do organismo alvo, visto que existem insetos que possuem proteases serínicas que não são suscetíveis aos inibidores; das condições fisiológicas internas do intestino (pH); da qualidade da dieta deste inseto, ou seja, a concentração do inibidor e a constante de interação deste com a protease; e por fim da habilidade dos insetos de se adaptarem à inibição das proteases pela modulação da expressão do gene da protease (Broadway, 1995; Oppert et al., 1993; Christeller et al., 1992).

Dois artigos recentes (Oliveira et al., 2002; Macedo et al., 2002a) demonstraram efeitos negativos no desenvolvimento larval do Gorgulho *Callosobruchus maculatus* sob alimentação artificial com inibidores de tripsina tipo Kunitz. Oliveira et al. (2002) propõe que o efeito deletério sobre este inseto esteja relacionado com uma possível atividade de cisteinoproteases para o inibidor de Kunitz.

Macedo et al. (2002a) têm associado os efeitos de resistência ao desenvolvimento larval do Gorgulho ao fato destes inibidores de Kunitz reconhecer e se ligar a polissacarídeos do tipo quitina encontrado no intestino médio destes insetos diminuindo a absorção de nutrientes. Ao que tudo indica, vários fatores devem ser levados em consideração ao avaliar os efeitos negativos dos inibidores de Kunitz sobre esses insetos.

II. OBJETIVOS

Várias famílias de inibidores já foram descritas e estudadas sobre diversos aspectos. Os inibidores de serinoproteases (tripsina), na atualidade, são os mais estudados, principalmente, em sementes de Leguminosae, em virtude da sua provável influência no valor nutritivo destas sementes entre outras atividades fisiológicas. Contudo, esparsos são os dados sobre os inibidores de tripsina em plantas do Cerrado. Assim, esta tese teve por objetivos:

- Realizar a caracterização estrutural das isoformas do inibidor CTI purificado de sementes de Copaíba, estabelecendo os pontos isoelétricos e quantidades de isoformas através de eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massas, caracterizando a composição global de aminoácidos e realizando um alinhamento da região N-terminal das subunidades de CTI determinando e comparando as massas dos peptídeos gerados por digestão trípica das isoformas das subunidades do inibidor CTI por espectrometria de massa (MALDI-TOF);
- Determinar a estrutura primária do inibidor de tripsina CTI-1 de sementes de *Copaifera langsdorffii* utilizando como plataforma experimental gel de eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massa (MALDI-TOF e ESI-QTOF) e realizar um estudo comparativo de homologia seqüencial com outros inibidores do tipo Kunitz da literatura;
- Obter cristais da proteína purificada e determinar o modelo da estrutura tridimensional do inibidor CTI por biocristalografia, por intermédio da colaboração interdisciplinar, esclarecendo aspectos instigantes que ajudaram a compreender em parte o comportamento bioquímico desses inibidores;
- Entender os padrões comuns, do ponto de vista da estrutura primária e tridimensional, e correlacionar regiões eletronicamente ativa que definem particularidades funcionais do inibidor CTI, determinando as constantes de inibição para a enzima tripsina e verificando se os resíduos de aminoácidos existentes nos sítios reativos são efetivamente funcionais;
- Realizar um estudo minucioso da estabilidade estrutural e funcional do inibidor CTI, verificar a ação de agentes caotrópicos, (uréia e cloreto de guanidina), do agente redutor (DTT) e sob variadas condições de pH em temperaturas diferentes, através de gel de eletroforese, ensaios cinéticos, cromatografia de gel filtração, dicroísmo circular e fluorescência como técnicas de monitoramento de alterações na estrutura secundária e terciária.

III. MATERIAIS

A PLANTA – SEMENTE DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)

Copaifera langsdorffii Des., vulgarmente conhecida por Copaíba ou Óleo-de-copaíba (Figura 04), é uma leguminosa da Subfamília Caesalpinoideae típica do cerrado ou de áreas de transição entre o cerrado e florestas latifoliadas semidecíduas. Essa planta apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Alcançam uma altura de 10-15 metros, com tronco de 50 a 80 cm de diâmetro, folhas compostas pinatífidas, com 3-5 folíolos alternos ou opostos, de 4-5 cm de comprimento (Lorenzi, 1992).



Figura 04 - Árvore e semente de *Copaifera langsdorffii* (Lorenzi, 1992).

A árvore é majestosa e elegante, além de proporcionar ótima sombra, pode ser utilizada com sucesso no paisagismo e, em geral, são úteis para plantios em áreas degradadas de preservação permanente (Lorenzi, 1992). Essa planta chama muita atenção por fornecer o bálsamo ou óleo, produto de interesse comercial; um líquido transparente e terapêutico, que é a seiva extraída mediante a aplicação de furos no tronco até atingir o cerne. Paiva et al. (1998) analisaram os efeitos deste óleo na proteção contra danos gástricos ocasionados por etanol e stress, e sugerem que este tradicional remédio apresenta-se como um potencial gastroprotetor.

Normalmente floresce durante os meses de dezembro a março. Os frutos amadurecem durante os meses de agosto a setembro, com a planta quase totalmente despida de folhagem. Suas sementes são duras e envolvidas por um arilo amarelo, servindo de alimento para muitos pássaros, que atuam como dispersores dessas sementes (Lorenzi, 1992). Pesquisas nos bancos de dados revelam ausência de estudo das proteínas de sementes de *Copaifera langsdorffii*. As sementes de Copaíba foram coletadas na região de Três Lagoas, no Estado de Mato Grosso do Sul.

O inibidor CTI foi purificado de farinha de sementes de Copaíba através da extração em tampão fosfato de potássio pH 7,6, NaCl 0,2M, seguido de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-Tripsina como descrito por Silva et al. (2001).

REAGENTES

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho apresentam grau analítico. DTT, iodoacetamida, fosfato de sódio dibásico foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); ácido trifluoroacético (TFA) da Fluka Chemical Corp. (Milwaukee, WI); tripsina modificada, clostripaina and endoproteanase Glu-C de *Staphylococcus aureus* (todas grau de sequência) foram obtidas da Promega, Madison, WI, U.S.A. Acetato de amônio, bicarbonato de amônio, fosfato de sódio, ácido acético glacial, acetonitrila, e metanol foram adquiridos da Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ). Todos os procedimentos de extração e purificação do inibidor estão descritos em Silva et al. 2001.

IV. MÉTODOS

A metodologia foi descrita considerando cinco aspectos que serão apresentados na forma de resultados obtidos seguidos de uma discussão relacionando caracterização estrutural das isoformas, sequenciamento de uma das isoformas de CTI, cristalização e determinação da estrutura tridimensional, caracterização funcional e caracterização da estabilidade conformacional do inibidor CTI. Em alguns momentos, foi necessário acrescentar à descrição metodológica, uma breve fundamentação teórica sobre algumas técnicas químicas e biofísicas atuais de forma delinear os aspectos mais elementares. Para maiores informações é fortemente recomendado que a literatura referenciada seja consultada.

01. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ISOFORMAS DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI***REDUÇÃO E CARBOXIMETILAÇÃO DAS SUBUNIDADES DE CTI***

Uma quantidade aproximada de 3 mg das subunidades de CTI provenientes da cromatografia de fase reversa (HPLC) foi dissolvida em tampão de redução (Guanidina 6M, Tris 0,6M, EDTA 0,1M) e adicionada uma solução de DTT à concentração final de 5mM incubando-se a amostra por uma hora sob atmosfera de nitrogênio. A proteína reduzida foi carboximetilada com iodoacetamida 0,1 M por três horas à temperatura ambiente. A dessalificação da amostra foi realizada em Sephadex G-25 equilibrada em ácido acético 1,0 M. Os tubos contendo proteínas, monitoradas a 280 nm, foram liofilizados e utilizados para a determinação da composição de aminoácidos e da estrutura primária da região N-terminal.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – TRICINA

Um gel de eletroforese SDS-Tricina foi usado para verificar e diferenciar o perfil da massa molecular das subunidades de CTI cromatografadas em coluna de fase reversa C18. O método utilizado foi essencialmente aquele descrito por Shagger et al. (1987) com modificações, para detectar proteínas de baixa massa molecular.

O gel de poliacrilamida foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida - bisacrilamida (49.5%T; 3%C) e tampão para gel (*buffer gel*). O gel de corrida foi composto de 4,0 g de glicerol 89%, em 10 mL de tampão para gel (Tris-HCl, 3 M, SDS 0,3%, pH 8,43), PSA 0,025% (100 mg/mL), 6,1 mL de solução estoque e TEMED 0,05%, em volume final de 30 mL para cada gel. O gel de separação (*spacer gel*) foi preparado com tampão de gel 10 mL, solução estoque de acrilamida 10 mL para um volume final de 30 mL com água desionizada.

Após a polimerização por 12 horas, os géis de corrida e separação foram adicionados simultaneamente entre as duas placas de vidro (sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small - Hoefer Scientific Instrumentos, San Francisco, USA) devidamente limpas com álcool, o gel superior foi confeccionado usando 1,0 mL de solução estoque de acrilamida em 3,1 mL de *buffer gel*, 100 µL de PSA (100 mg/mL) e 0,1 % de TEMED, em um volume final de 12,5 mL.

As amostras (10 a 50 µg de proteínas) foram dissolvidas em tampão de amostra comercial (*sample buffer*, Laemmli - Sigma). No caso das amostras reduzidas, foi empregado DTT (100 mg/mL) no mesmo tampão e, em seguida, aplicado no volume máximo de 15 µL. A corrida eletroforética foi desenvolvida à temperatura ambiente, em tampão cátodo Tris-HCl 0,1 M / SDS 0,1 % pH 8,25 e tampão para o ânodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9, com duração aproximada de 7 horas sob corrente de 25 mA.

Após a corrida, o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo coomassie blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v:v), para coloração das proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v:v).

DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL DE AMINOÁCIDOS

Degradação automática de Edman

Este método foi utilizado para a determinação da porção N-terminal do inibidor. O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman (Edman & Begg, 1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo (**Figura 05**). Após a ativação de um filtro composto de papel e fibra de

vidro, a proteína é covalentemente unida à este suporte e, em seguida, colocada na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma p7 3 derivada de anilino-tiazolinona (ATZ). O ATZ aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltioidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão onde a identificação é realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH aminoácidos.

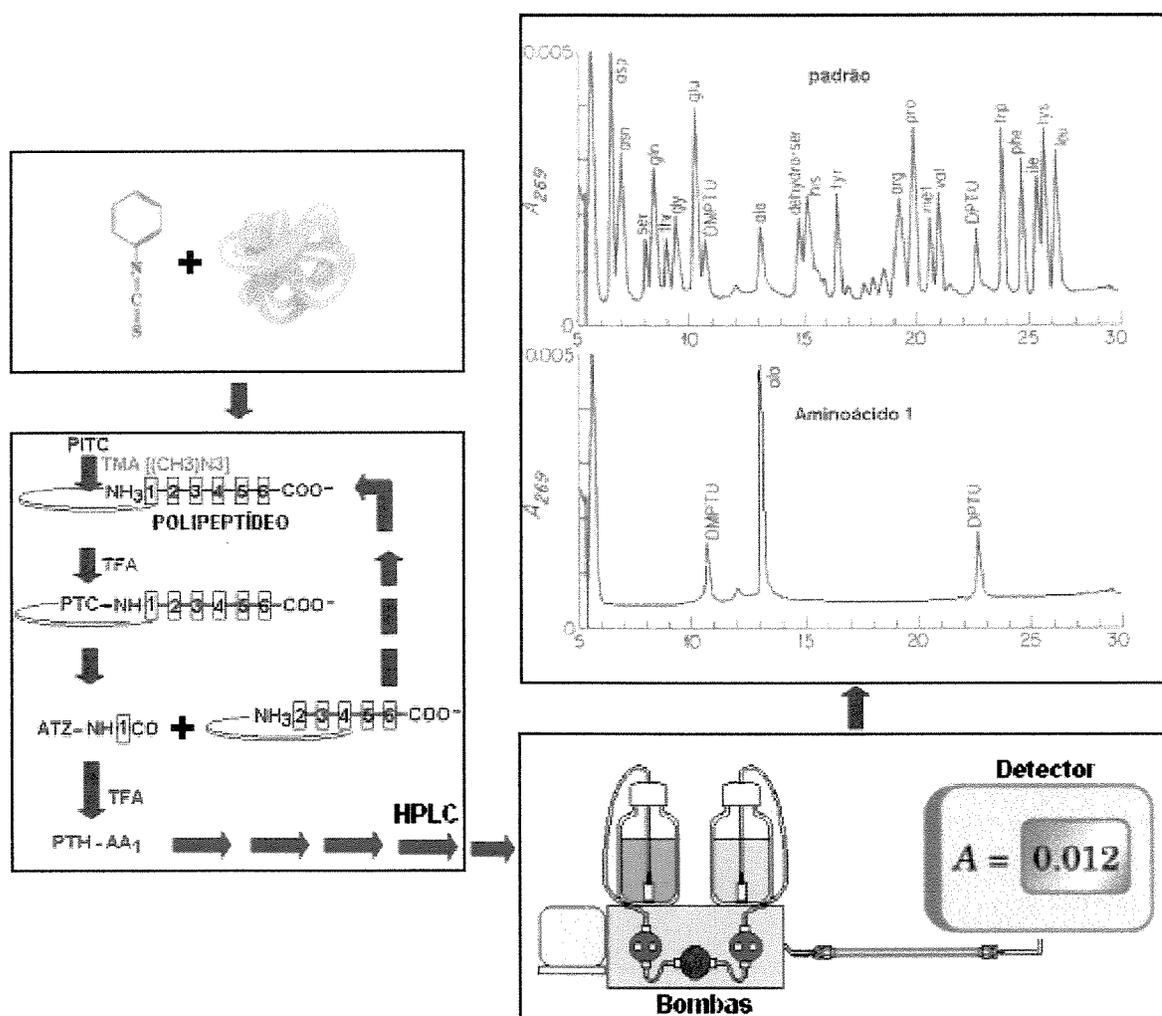


Figura 05 - Esquema simplificado do sequenciamento N-terminal dos resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo a partir da Degradação de Edman. A identificação é realizada por cromatografia de fase reversa em HPLC em comparação com um padrão.

Reagentes e tampão são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10 - 500 picomoles de proteínas ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1, 5 % fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12.5 % trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002 % de ditioneitol (DTT); R4, 25 % TFA em água com 0.01 % DTT; R5, acetonitrila, com 0.001 % DTT; S1 n-heptano; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20 % acetonitrila em água.

Aplicação da amostra

15 µg das subunidades de CTI reduzidas e carboximetiladas foram ressuspensas em 30 µL de solução de TFA 0,1 M e aplicados ao seqüenciador para que fosse obtida a seqüência de aminoácidos da região N-terminal.

Pesquisa da Homologia Seqüencial

A seqüência N-terminal das subunidades de CTI foi pesquisada, quanto sua homologia com outros inibidores de seqüências conhecidas usando os serviços eletrônicos BLAST - NCBI (Altschul et al., 1990) e BLITZ EMBL (Collins & Coulson, 1990).

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

15 µg das subunidades de CTI reduzidas e carboximetiladas foram dissolvidas em água e acetonitrila (1:1, v/v) e transferidas para tubos de reação em um volume de 20 µL. Estas foram colocadas dentro do frasco de reação, o qual possui tampa especial para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio que foram submetidas à hidrólise ácida e a derivatização.

Hidrólise Ácida

A hidrólise foi efetuada colocando-se no fundo do frasco de reação 200 µL de uma solução de HCl 6 M Fenol 0,1% para evitar a formação de clortirosina. Deve-se evitar que o ácido caia dentro dos tubos de reação. Em seguida foi feito vácuo próximo 1-2 Torr até o início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo deixou-se entrar nitrogênio (SS – Ultra puro) por 5 segundos. Repetiu-se essas etapas 3 vezes, sendo a última o vácuo mantido até

1 Torr, fechando o frasco de reação e levando-o até o forno para hidrólise a 106 °C por 24 horas. Após este período, os tubos de reação foram resfriados a temperatura ambiente, sendo as paredes dos tubos de reação lavados e estes transferidos para um frasco de reação limpo. O conteúdo dos tubos foi mantido a vácuo até 65 mTorr para secagem das amostras hidrolisadas.

Derivatização

As amostras hidrolisadas foram ressuspensas em 20 µL de uma solução de metanol trietilamina (2:2:1, v:v). Subseqüentemente, os tubos de reações foram agitados, centrifugados e colocados para evaporar sob vácuo até a leitura de 65 mTorr. Este procedimento foi realizado por três vezes para remover sais que poderiam estar adsorvidos nos aminoácidos.

O PITC foi removido com a utilização de metanol, trietilamina e feniltiocianato na relação 7:1:1:1 (v/v), sendo adicionado 20 µL a cada tubo de reação e deixados à temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após isso, as amostras foram secas a vácuo até a leitura de 50 mTorr para a completa remoção de todo o PITC. Cada amostra foi dissolvida em 50 µL de uma solução de 0,4 mM fosfato de sódio pH 7,4 acetonitrila 5%.

15 µg de amostra, após hidrólise e derivatização, foram aplicados a uma coluna C18 para cromatografia de fase reversa em sistema HPLC a fim de realizar a análise dos PITC aminoácidos, através de um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100 % de acetonitrila (60) % durante a corrida. A identificação de cada aminoácido foi feita através de uma corrida padrão de PITC aminoácidos.

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Algumas estratégias amplamente utilizadas nos estudos de proteoma foram importadas para a química de proteína, com o objetivo de caracterizar os pormenores das isoformas para o inibidor CTI purificado de sementes de Copaíba. Entre elas estão a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), a espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

40 µg de cada subunidade de CTI, obtidos diretamente da cromatografia de fase reversa, foram solubilizadas em solução 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM DTT, 0,5 % SDS. Essa solução foi aquecida à 95°C por 5 minutos e adicionada a solução contendo 8 M uréia, 4 % CHAPS, 70 mM DTT, 0,8 % ampholinas (IPG buffer, pH 3-10 não linear, Amersham Pharmacia Biotech) mais 0,005 % azul de bromofenol.

Após a agitação por um minuto, adicionou-se 2 mL de óleo mineral ("Fluid Cover", Amersham Pharmacia Biotech) às fitas IPG para se evitar a evaporação dos reagentes durante a rehidratação. As fitas IPG de 18 cm com gradiente de pH 3-10 não linear foram reidratadas no aparato para a focalização isoelétrica (IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech) durante 14 horas, em temperatura ambiente.

Nos estágios de focalização isoelétrica, utilizou-se diferente voltagem durante 1 hora, indicando o primeiro (150 V), o segundo (350 V) o terceiro (500 V) e o quarto estágio (1000 V). No quinto estágio utilizou-se 5000 V, por 12 horas, ou até atingir 60 kWh. Após a focalização isoelétrica, as fitas IPG foram lavadas com água bidestilada (ddH₂O) e equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfeto.

A primeira solução de equilíbrio era composta por 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 6 M uréia, 30 % (v/v) glicerol, 2 % SDS e 2 % DTT. A segunda solução era composta por 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 6 M uréia, 30 % (v/v) glicerol, 2 % SDS, 2,5 % iodoacetamida e 0,05 % azul de bromofenol. As fitas IPG foram equilibradas por 12 minutos em cada solução.

SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel de poliacrilamida vertical homogêneo, com sistema descontínuo, conforme descrito por Laemmli (1970) e modificado. O gel foi preparado com 12,5 % bis-acrilamida (37, 5:1, m:m), 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia, e 0,05 % TEMED. Após o equilíbrio as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e cobertas com uma solução de agarose 0,5 % em tampão Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e /SDS 0,1%).

O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina. A separação eletroforética das proteínas foi feita a 10 °C, em cuba SE 600 (Amersham Pharmacia Biotech). Na primeira etapa, utilizou-se 90 V fixos durante 30 minutos e na segunda etapa, 30 mA por gel, durante

aproximadamente 3-4 horas. Em seguida, os géis foram lavados em água bidestilada por 5 minutos e as proteínas foram então coradas com prata.

Coloração das Proteínas por Impregnação com Prata

A coloração das proteínas foi efetuada segundo Blum et al. (1987) com modificações. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e utilizadas seqüencialmente, conforme descrito a seguir. Solução fixadora (metanol 50 %, ácido acético 12 % e formaldeído 0,028%) por 12 h; 50/5 etanol, 3 x 20 min; solução de sensibilização (0,2/5 tiosulfato de sódio) por 1 min. Água bidestilada 3 x 20s; solução de impregnação (nitrito de prata 0,2 %, formaldeído 0,028 %) por 20 min; água bidestilada 3 x 20s; solução reveladora (carbonato de sódio 6 %, tiosulfato de sódio 0,4 %; formaldeído 0,018 %) até o aparecimento dos *spots* e solução de paralisação (5 % ácido acético) por 10 min.

Digestão triptica das isoformas das subunidades de CTI

Os seis *spots* derivados do gel de eletroforese SDS-PAGE 2D das subunidades CTI-I e CTI-II foram submetidos à digestão com tripsina e as massas dos peptídeos foram analisadas por espectrometria de massa. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com coomassie blue R-250 (Bio-Rad), metanol 50 % e ácido acético 10 % e descorado com metanol 40 % e ácido acético 10 %.

A digestão triptica das proteínas no gel foi efetuada com modificações dos métodos descritos por Rosenfeld et al. (1992) e Jenő et al. (1995). Acetonitrila 100 % foi adicionado por duas vezes aos fragmentos do gel, contendo as proteínas de interesse, e incubado por 10 minutos sendo posteriormente evaporada utilizando um evaporador rotativo *Speed Vac Plus*, (Savant).

Os fragmentos acima tratados foram imersos em uma solução de tripsina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em bicarbonato de amônio 50 mM e incubados por 40 minutos no gelo, sendo em seguida colocados em banho-maria por 12 horas. A ação da tripsina foi bloqueada com uma solução de acetonitrila 50 % e ácido fórmico 5 %. Acrescentou-se então bicarbonato de amônio 20 mM e incubou-se por 30 minutos. Os peptídeos foram retirados da matriz de acrilamida com três lavagens de 10 minutos com acetonitrila 50 % e ácido fórmico 5 %. Os peptídeos extraídos e armazenados foram, posteriormente, sonicados por 10 minutos e o excesso de acetonitrila evaporado no *Speed Vac Plus* (Savant).

Espectrometria de massas das subunidades de CTI

Determinação da Massa Acurada das Isoformas

A espectrometria de massas foi utilizada para realizar a determinação acurada da massa molecular do inibidor CTI, de forma a compreender melhor a organização das subunidades de CTI. A massa molecular das subunidades de CTI foi determinada usando espectrômetro Voyage-RP (PerSeptive Biosystems, USA) *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometer* (MALDI-TOF-MS). A calibração externa foi feita com albumina bovina. A leitura das massas de peptídeos foi realizada no LAQUIP, UNICAMP.

As amostras foram dissolvidas com a fase móvel (acetonitrila: H₂O, 1:1) e injetadas com uma bomba de perfusão a um fluxo de 5 µl/min. Para tais análises, utilizou-se como matriz o ácido α-ciano-4-hidroxicinnâmico. A fase móvel foi acidificada com formato a 0,5 % para os experimentos realizados no modo positivo. Os experimentos no modo negativo foram realizados com uma outra fase móvel (H₂O: Propanol e amônia 1%, 1:1).

As amostras analisadas foram diluídas para obter-se uma concentração entre 20 e 30 pmoles/µl. As otimizações dos parâmetros para as aquisições dos dados da proteína pura foram realizadas, a uma resolução de 2Da à meia altura do pico. A aquisição dos dados foi verificada pela programação do monitoramento MS1 sobre a amplitude de massa de 1100 a 2500 *m/z* a 10 segundos / esquadramento com um retardo de leitura de 0,1 segundos e coletando-se dados de 10 esquadramentos.

O instrumento foi calibrado com BSA (albumina bovina sérica) a uma amplitude de 900 a 2500 *m/z* de acordo com as especificações do manual no modo de esquadramento ou estático. Todos os espectros obtidos tanto no modo negativo como positivo, foram elaboradas utilizando-se o pacote de programas da MASSA-LINX.

Determinação de Resíduos de Cisteínas

A redução e S-carboxiamidometilação da proteína CTI foi usada para se determinar as pontes dissulfeto. A redução das pontes dissulfeto da proteína foi realizada utilizando-se o composto DTT dez vezes a razão molar do número de meia cistina esperada para os

inibidores do tipo Kunitz, em tampão bicarbonato de amônio (pH 8,0), por trinta minutos a 37°C. A S-carboxiamidometilação foi realizada com iodoacetamida 5 vezes a razão molar do número de grupos tióis, no escuro por uma hora. A proteína reduzida, S-carboxiamidometilada e reduzida e carboxiamidometilada foi dessalificada por precipitação por etanol e acetona. O precipitado resultante foi concentrado em *Speed Vac Plus*. Cada mistura foi dissolvida em 0.1 % de TFA e analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF.

Espectrometria de massa dos digestos a partir do gel de duas dimensões

Um décimo do volume dos peptídeos extraídos e armazenados foi purificado usando Zip Tip C18 (Millipore) e misturado com de acetonitrila 60 % e ácido trifluoroacético 0,1 % (TFA). As amostras foram misturadas na proporção 1:1 com a matriz α -ciano (CHCA), e alíquotas de 1 μ L foram aplicadas na placa de leitura do espectrômetro Voyager™ Biopectrometry (Applied Biosystems) operando em modo refletor positivo.

02. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)

CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas tem sido uma ferramenta indispensável na química de proteínas. As moléculas ao serem analisadas são inicialmente ionizadas. Quando as moléculas, agora carregadas, são introduzidas em um campo elétrico e/ou magnético, suas trajetórias através do campo são uma função de sua razão massa/carga, m/z (Figura 06). Esta propriedade mensurável das espécies iônicas pode ser usada para deduzir com grande precisão a massa (M) da substância a ser analisada (Siuzdak, 1994; Andersen et al., 1996; Bischoff & Luider, 2004).

Embora a espectrometria de massas esteja em uso há vários anos, ela não podia ser aplicada à macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. As determinações de m/z são feitas em moléculas na fase gasosa e o calor ou outro tratamento necessário para levar uma macromolécula para a fase gasosa, geralmente causava sua rápida decomposição. Em 1988, duas técnicas diferentes de ionização foram desenvolvidas para superar essa dificuldade (Andersen et al., 1996; Siuzdak, 1994).

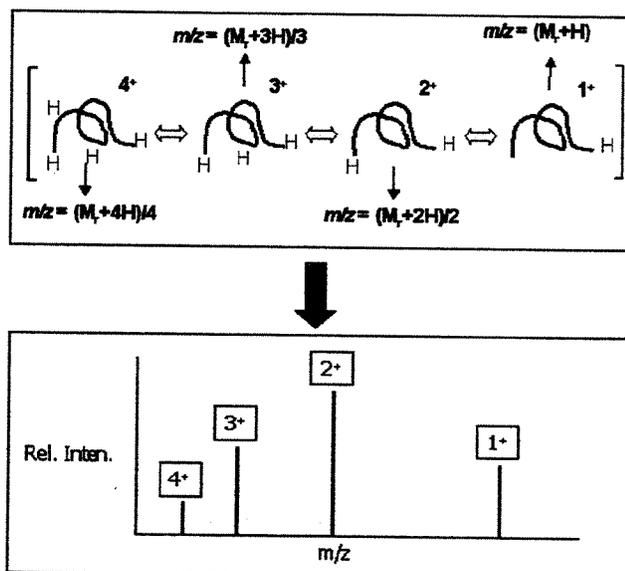


Figura 06 - Esquema simplificado de ionização de uma macromolécula proteica. A proteína pode receber diferentes números de prótons, resultante em cargas distintas. Abaixo, visualização do espectro de massa de uma mesma proteína ionizada com cargas diferentes.

A espectrometria de massas fornece uma abundante informação para a pesquisa proteômica, para a enzimologia e para a química de proteínas em geral. A vantagem desta técnica relaciona-se com a pequena quantidade de amostra necessária no experimento, de modo que podem ser facilmente aplicadas a pequenas quantidades de proteínas extraídas de géis de eletroforese bidimensionais. Uma vez que a massa de uma proteína seja precisamente conhecida, a espectrometria de massa é um método exato e conveniente para detectar alterações na massa devido à presença de co-fatores e íons metálicos ligados à proteína (Siuzdak, 1994; Andersen et al., 1996; Bischoff & Luider, 2004).

Espectrometria de Massas por MALDI-TOF

Essa técnica é denominada por espectrometria de massas por dessorção/ionização a “*laser*” auxiliado por uma matriz (*Matrix assisted laser desorption mass spectrometry*, MALDI-TOF MS). Neste caso, a ionização da amostra ocorre através de um *laser* em um suporte excitável, onde as proteínas são colocadas em uma matriz que absorve luz (**Figura 07**). Com um breve pulso de “*laser*”, as proteínas são ionizadas e, em seguida, dessorvidas da matriz, indo ao sistema a vácuo. Os mapas peptídicos resultantes da análise por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF de um digesto tríplico de interesse, permitem a identificação de algumas proteínas quando comparados aos mapas peptídicos de proteínas digeridas teoricamente, presentes nos bancos de dados (Mann et al., 2001).

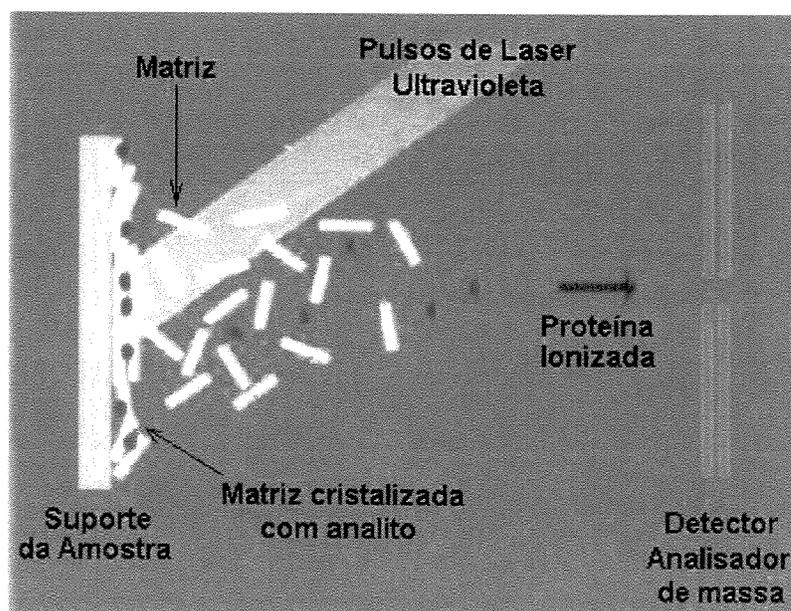


Figura 07 - Esquema da ionização por espectrometria de massa por dessorção/ionização a “*laser*” assistido por uma matriz – MALDI-TOF (Adaptado de Siuzdak, 1994).

Espectrometria de Massas por ESI-MS

Essa técnica é denominada por espectrometria de massas por ionização e electrospray (*Electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS). Nesse método, as macromoléculas em solução são injetadas através de uma microseringa diretamente da fase líquida para a fase gasosa. Uma solução de moléculas a ser analisada atravessa uma agulha carregada que é mantida em elevado potencial elétrico, dispensando a solução em um fino aerossol de micro gotas carregadas. O solvente que envolve as macromoléculas rapidamente se evapora e os íons macromoleculares com cargas múltiplas são introduzidos na fase gasosa, sem serem destruídos. A amostra ao passar pela agulha passa por um processo de retirada de ânions deixando ela carregada positivamente. A razão m/z da molécula pode ser analisada na câmara a vácuo.

O processo para determinar a massa de uma proteína com ESI MS (**Figura 08**), evidencia a aquisição de um número variado de prótons, à medida que amostra é injetada na fase gasosa. Isso cria um espectro com diferentes razões massa/carga. Cada pico sucessivo corresponde a uma espécie que difere por apresentar diferentes números de cargas. A massa da proteína pode então ser determinada a partir de dois picos vizinhos quaisquer (Andersen et al., 1996; Bischoff & Luider, 2004).

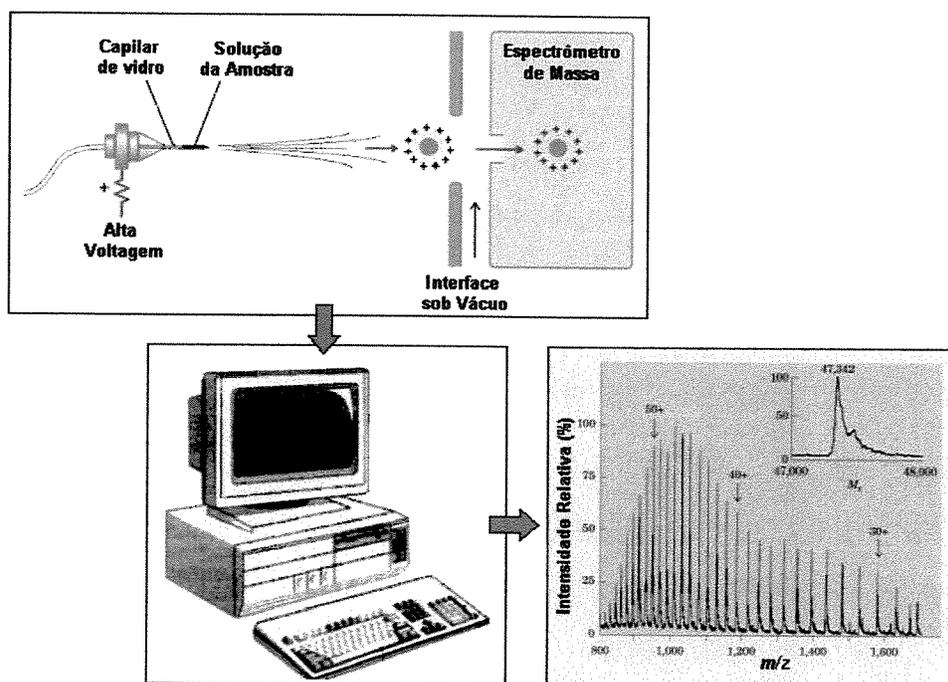


Figura 08 - Esquema simplificado da ionização por eletropulverização pelo espectrômetro de massa ESI. Abaixo, tem-se o espectro de massas convertido por software específico.

Espectrometria de Massas no Sequenciamento de Aminoácidos

A espectrometria de massas também pode ser usada no sequenciamento de pequenos trechos de um polipeptídeo, uma aplicação que surgiu como uma ferramenta valiosa para identificar rapidamente proteínas desconhecidas. A informação relativa à seqüência é obtida usando-se uma técnica denominada MS seqüencial ou MS/MS.

Uma solução, que contém a proteína sob investigação, é inicialmente tratada com uma protease ou reagente químico, a fim de reduzi-la, por clivagem hidrolítica, a uma mistura de peptídeos mais curtos (**Figura 09**). A mistura é, a seguir, injetada em um instrumento constituído essencialmente por dois analisadores de massas em seqüência. No primeiro, a mistura peptídica é separada e os fragmentos ionizados são manipulados de modo que apenas um dos diversos tipos de peptídeos produzidos pela clivagem possa emergir na outra extremidade (Mann & Wilm 1995; Andersen et al., 1996; Mann et al., 2001; Bischoff & Luidner, 2004).

A molécula do peptídeo selecionada, que possui uma carga em alguma posição ao longo de sua extensão, percorre uma câmara a vácuo entre os dois analisadores de massas. Nessa célula de colisão, o peptídeo é fragmentado por impactos de baixa energia com um “gás de colisão”, (uma pequena quantidade de um gás como argônio ou nitrogênio que é injetado no interior da câmara a vácuo). Esse procedimento é desenhado para fragmentar muitas moléculas de peptídeos da amostra, sendo cada peptídeo clivado. A maioria das quebras ocorre nas ligações peptídicas. A fragmentação não envolve a adição de água (é realizada em quase vácuo), de modo que os produtos podem incluir grupos moleculares como os grupos carbonila (Mann & Wilm 1995; Andersen et al., 1996; Mann et al., 2001; Bischoff & Luidner, 2004).

A massa do peptídeo original é retirada em um dos fragmentos gerados a partir dele. O segundo analisador de massa mede as razões m/z de todos os fragmentos carregados (fragmentos não carregados não são detectados). Isso gera um ou mais conjuntos de picos, que consistem de todos os fragmentos carregados que foram gerados pelo rompimento do mesmo tipo de ligação (mas em diferentes pontos do peptídeo) e derivados do mesmo lado da quebra da ligação, seja o carboxiterminal ou o aminoterminal. Cada pico sucessivo em um determinado conjunto possui um aminoácido a menos que o pico anterior. A diferença na massa entre os ions permite identificar o aminoácido que foi perdido em cada caso,

revelando dessa forma, a seqüência do peptídeo. As únicas ambigüidades envolvem a leucina e a isoleucina, glutamina e a lisina que possuem massas moleculares similares. Deve-se tomar cuidado com aqueles resíduos que somados dão a impressão de somente um resíduo (Mann & Wilm 1995; Andersen et al., 1996; Mann et al., 2001; Bischoff & Luiders, 2004).

Com o avanço de algumas tecnologias a análise direta de misturas complexas de peptídeos obtidos por digestão enzimática de determinadas proteínas foi muito facilitada pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (*liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS-MS*). Através dessa técnica, peptídeos com tempos de eluição similares podem ser selecionados, isolados e fragmentados seqüencialmente e, automaticamente, dentro do espectrômetro sem sobreposição dos padrões de fragmentação. Assim, informações de seqüências para milhares de peptídeos podem ser obtidas em um único ensaio LC-MS/MS.

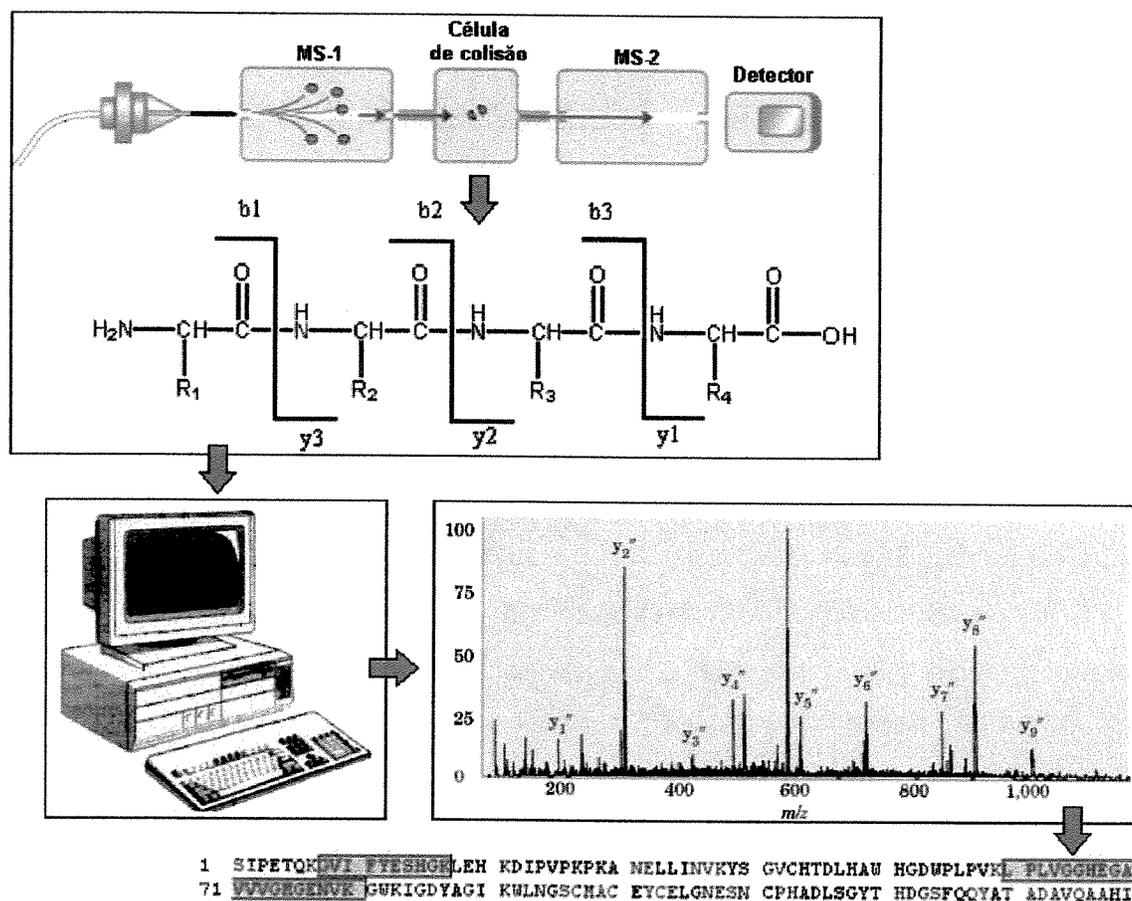


Figura 09 - Esquema simplificado do funcionamento do espectrômetro de massa MS seqüencial ou MS/MS no sequenciamento de pequenos trechos de um polipeptídeo.

SEQUENCIAMENTO DO INIBIDOR CTI

O sequenciamento dos resíduos de aminoácidos da estrutura primária do inibidor CTI foi realizado combinando-se técnicas de eletroforese de duas dimensões, digestão *in gel* e espectrometria de massas (MALDI-TOF e ESI-QTOF), como evidenciado pela **Figura 10**. Devido à impossibilidade de seqüenciar todos os *spots*, observados em gel de eletroforese de duas dimensões, escolheu-se os *spots* A e F. Procurou-se simplificar a interpretação dos dados da espectrometria de massas para seqüenciar peptídeos não conhecidos usando como referencial SBTI, outros inibidores de seqüência conhecida e os dados da seqüência prevista por densidade eletrônica a partir dos cristais obtidos de CTI. A estrutura primária de CTI-1 foi obtida de acordo com os passos experimentais abaixo:

- Separação das isoformas das subunidades de CTI-I e CTI-II por gel de eletroforese bidimensional e seleção dos *spots* para cada subunidade de CTI;
- Clivagem enzimática dos *spots* selecionados com as enzimas: tripsina, clostripaína e protease SV8;
- Determinação do mapa de peptídeos dos digestos por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento por HPLC capilar acoplado a um espectrômetro de massa ESI-QTOF;
- Estudo de sobreposição dos peptídeos, a partir da massa determinada por MALDI-TOF e da seqüência determinada;
- Alinhamento dos fragmentos peptídicos e comparação da homologia seqüencial com a seqüência primária de outros inibidores disponíveis na literatura.

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA IN GEL

Os *spots* A e F do gel de eletroforese bidimensional realizado segundo descrito anteriormente nas páginas 26 e 27 (A e F) para cada subunidade do inibidor CTI foram recortados e tratados com proteases. Os *spots* selecionados foram submetidos à digestão com três proteases diferentes. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com coomassie blue R-250 (Bio-Rad), metanol 50 % e ácido acético 10 % e descorado com

metanol 40 % e ácido acético 10 %. A digestão das proteínas no gel foi efetuada segundo Rosenfeld et al. (1992) e Jenö et al., (1995), seguindo algumas modificações.

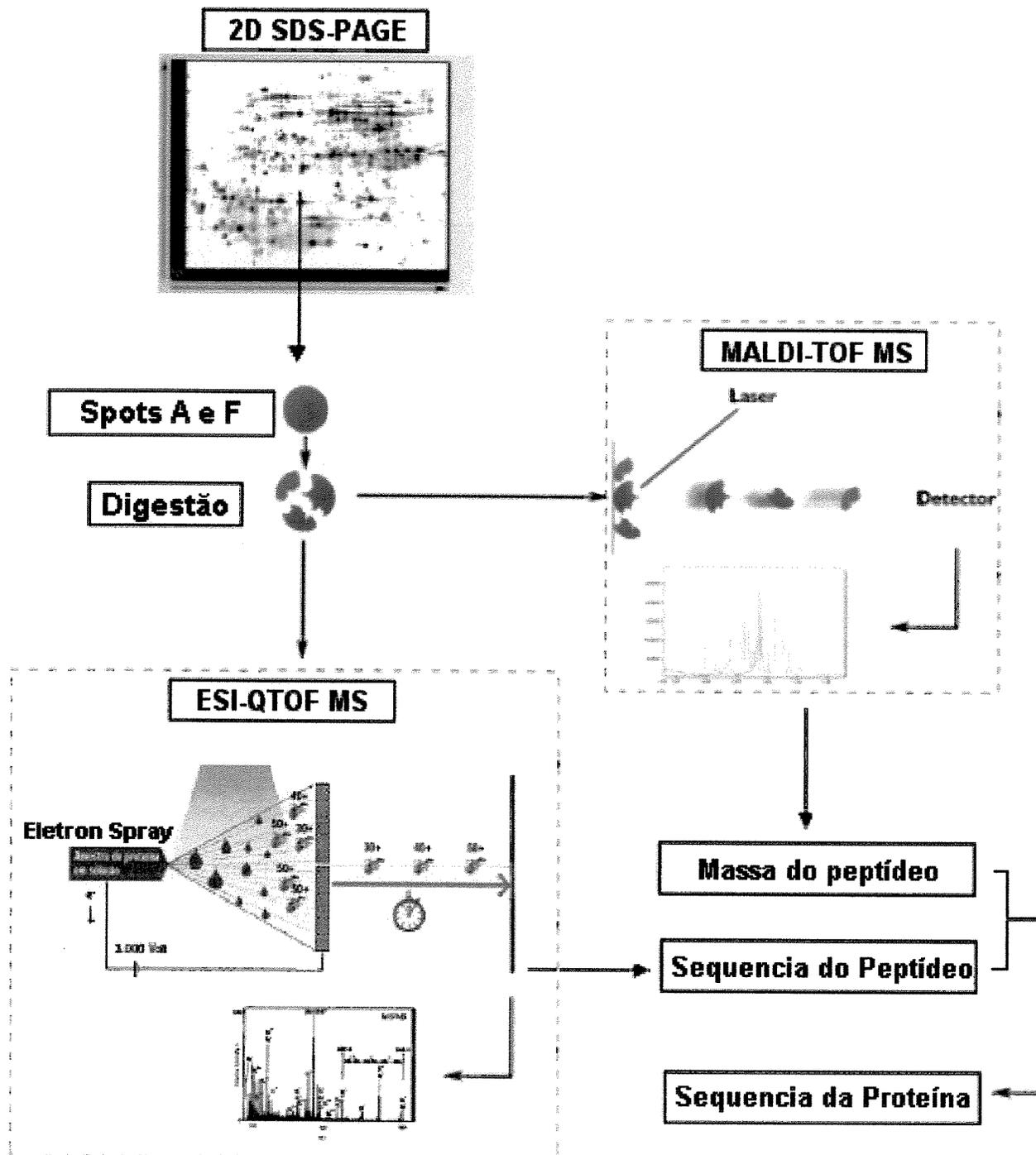


Figura 10 - Plataforma experimental utilizada no sequenciamento dos *spots* mais intenso (A e F) para cada subunidade (CTI-I e CTI-II) do inibidor CTI purificado de sementes de copaíba.

Acetonitrila 100 % foi adicionada por duas vezes aos fragmentos do gel contendo proteínas de interesse e incubados por 10 minutos sendo, posteriormente, a amostra evaporada utilizando um evaporador rotativo *Speed Vac Plus* (Savant). Utilizou-se tripsina, endoproteases Glu-C de *Staphylococcus aureus* e clostripaína. Para a tripsina e clostripaína, a razão molar proteína/protease foi de 10:1. Os *spots* tratados com as proteases (na concentração final de aproximadamente 6 µg/ml) foram incubados em tampão bicarbonato de amônio 40 mM por 12 horas a 37°C. Para a endoprotease Glu-C, os *spots* foram digeridos em tampão bicarbonato de amônio 50 mM na razão molar enzima/substrato de 1:50 a 37 °C por 6 horas.

A ação das proteases foi bloqueada com uma solução acetonitrila 50 % e 5 % ácido fórmico. Acrescentou-se então, bicarbonato de amônio 20 mM e incubou-se por 30 minutos. Os peptídeos foram retirados da matriz de poliacrilamida com três lavagens de 10 minutos com acetonitrila 50 % e ácido fórmico 5 %. Os peptídeos extraídos e armazenados foram, posteriormente, sonicados por 10 minutos e o excesso de acetonitrila foi evaporado no *Speed Vac Plus* (Savant). Em todas as digestões, a solução de protease foi evaporada. Os *spots* foram ressuspensos em TFA 0,1 %. O digesto foi purificado usando Zip Tip C18 (Millipore) e misturado com de acetonitrila 60 % e ácido trifluoroacético 0,1 % (TFA).

USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO SEQUENCIAMENTO DE CTI

Espectrometria de Massas por MALDI-TOF

Uma alíquota dos peptídeos extraídos do gel bidimensional, após a digestão proteolítica, foi analisada no espectrômetro de massas MALDI-TOF de forma obter o mapa peptídico das subunidades de CTI. As amostras (diluídas 1:200) foram misturadas na proporção 1:1 com a matriz α -ciano (CHCA), e alíquotas de 1 µL foram aplicadas diretamente na placa de leitura do espectrômetro Voyager™ Biopectrometry (Applied Biosystems) operando em modo refletor positivo. A calibração interna foi executada usando produtos da autodigestão da tripsina (842.509, 1045.563 e 2211.104 m/z).

Espectrometria de Massas por ESI-MS

A seqüência dos peptídeos foi determinada para os digestos enzimáticos que foram analisados por nanocromatografia líquida acoplada à fragmentação via espectrômetro de massa, nano-LC/MS/MS, usando um aparelho híbrido Q-TOF micromass. Alíquotas de 50 μL de cada amostra foram colocadas em um carregador automático e injetado em um “trap” capilar (0,5 x 2 cm) com fluxo constante de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ para concentrar e dessalinizar as amostras. Em seguida, o “trap” capilar foi ligado em série a uma coluna (17 μm x 15 cm) C18 de fase reversa (PepMap, LC Packings, USA) acoplado diretamente ao espectrômetro de massa. Os peptídeos foram eluídos com gradiente de solução B por 80 minutos, onde a solução A consistiu de água 98 %, acetonitrila 2 %, ácido fórmico 0.1 % e TFA 0.01 %, usando um fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e uma saída de 300 nL/min para a coluna.

Os espectros de massas ESI dos peptídeos foram obtidos a partir de um espectrômetro de massas Q-TOF Micromass usando a escala de 700-2100 de m/z . O instrumento foi calibrado usando os íons do trifluoroacetato de sódio. Após a calibração, o espectrômetro de massa foi capaz de determinar a massa acurada dos peptídeos com a exatidão de pelo menos 0.007 % para o espectro deconvoluído.

Cada espectro de massa resultante, que contém uma distribuição de estados de carga para cada espécie de peptídeo na amostra, foi obtido acumulando vários espectros (no mínimo 10 varreduras). Então, o espectro de massa do ESI foi deconvoluído usando o software MassLynx da Micromass de forma obter a massa molecular de cada peptídeo.

Nitrogênio e argônio foram usados como gases para nebulização e colisão, respectivamente. A voltagem de energia de colisão era ajustada automaticamente e manualmente dependendo do valor m/z e carga do íon precursor. A escala de massa (m/z) foi externamente calibrada pelas medidas (MS/MS).

03. ESTUDOS CRISTALOGRÁFICOS E ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE CRISTALOGRAFIA DE PROTEÍNAS

Para determinar a forma de objetos a nossa volta, basta simplesmente olhar para eles. Se eles forem muito pequenos, basta buscar um microscópio. Entretanto, existe um limite para o quão pequeno um objeto possa ser para a visualização em um microscópio óptico. Esse limite, o *limite de difração*, é dado pelo comprimento de onda da luz usada, pois não é possível formar a imagem de um objeto muito menor do que esse comprimento de onda. O comprimento de onda para a luz visível é da ordem de centenas de nanômetros enquanto os átomos são separados por distância da ordem de 0,1 nanômetro ou 1Å (Kendrew, 1961; Branden & Tooze, 1991; Bella et al., 1994).

Assim, objetos menores do que a metade do comprimento de onda da luz incidente, não podem ser resolvidos. Para resolver objetos tão pequenos, quanto uma proteína, devem-se utilizar raios-X, cujos comprimentos de ondas situam-se na faixa adequada de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). Entretanto, não existem lentes que possam recombinar os raios X para formar uma imagem; por isso, o padrão de raios X difratados é diretamente recolhido e uma imagem é reconstruída por técnicas matemáticas (Matthews, 1977).

O conhecimento da estrutura tridimensional e da função das proteínas foi muito enriquecida pela cristalografia com raios X, uma técnica que pode revelar as posições tridimensionais da maioria dos átomos em uma molécula de forma precisa. A estrutura terciária de uma proteína descreve assim, o dobramento dos elementos secundários e especifica as posições de cada átomo na molécula proteica, incluindo as cadeias laterais (Matthews, 1977; Kendrew, 1961). As coordenadas atômicas da maioria dessas estruturas obtidas por cristalografia de raio-X estão depositadas em bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB). Tais dados podem ser acessados via Internet (<http://www.pdb.bnl.gov>), permitindo a análise e a comparação das estruturas terciárias de uma variedade de proteínas. A característica comum da estrutura terciária das proteínas revela muitas informações sobre suas funções biológicas e suas origens evolutivas. Os três componentes de uma análise cristalográfica com raios-X são: um cristal de proteína, uma fonte de raios X e

um detector (Matthews, 1977; Kendrew, 1961; Bella et al., 1994). Consideremos alguns aspectos básicos desse poderoso método.

O cristal

A quantidade de informação obtida a partir da cristalografia de raios X depende do grau de ordem estrutural da amostra. Informações mais detalhadas sobre a estrutura tridimensional das proteínas requerem cristais altamente ordenados, ou seja, os cristais da proteína de interesse devem apresentar todas as moléculas com uma orientação precisa. Os cristais são obtidos pela adição de um precipitante em solução concentrada de proteína, o que reduz a sua solubilidade. Esse processo lento favorece a formação de cristais altamente ordenados em vez de precipitados amorfos. Algumas proteínas cristalizam-se prontamente, enquanto outras, só o fazem depois de muitos esforços despendidos para encontrar as condições ideais (Rhodes, 1993; Kyte, 1995).

A produção de raios-X

Quando uma partícula se move no vácuo, com ausência de força, sua energia se conserva. Porém, se ela chocar-se com um obstáculo, ou for freada, parte de sua energia se transforma em radiações eletromagnéticas, mais precisamente em um fóton de radiação. O comprimento de onda da radiação emitida depende da quantidade de energia perdida pela partícula. Quanto maior essa energia, maior a frequência da radiação emitida e menor, portanto, seu comprimento de onda (Figura 11).

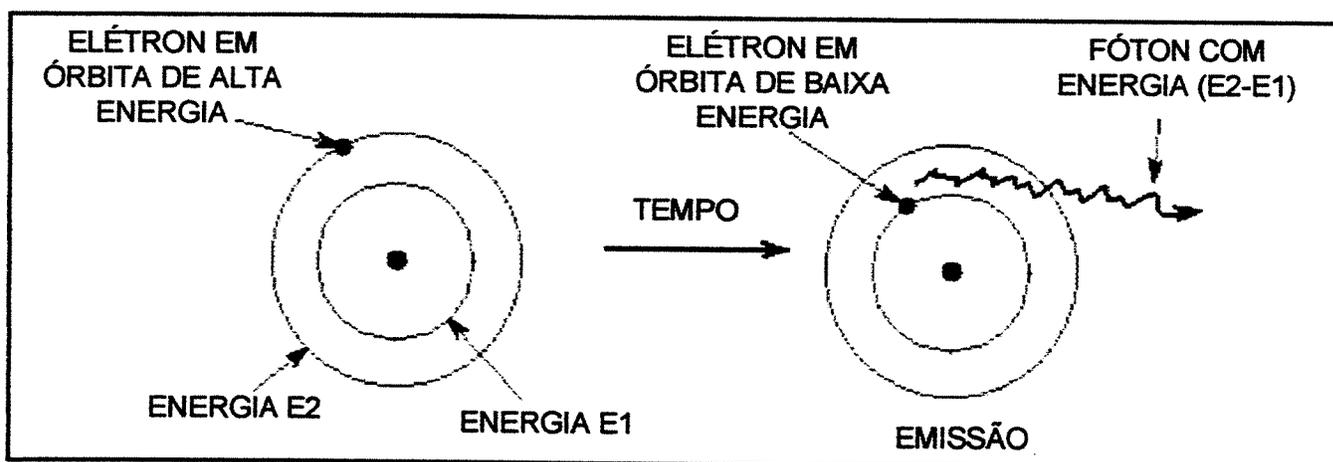


Figura 11 - Representação da produção de uma radiação eletromagnética

Um elétron livre, movendo-se no espaço, ao ser acelerado por um canhão eletrônico ou outro tipo de acelerador, pode assumir qualquer valor de energia cinética. Inversamente, pode perder uma quantidade de energia ao sofrer um freamento. Por isso, pode emitir raios-X dotados de qualquer valor de frequência. Freando diversos elétrons, todos dotados de energias diferentes (o que se consegue muito simplesmente mediante o choque com um sólido), obtém-se uma radiação X que contém todos os comprimentos de onda e é denominada de radiação contínua (Matthews, 1977; Kendrew, 1961).

Pode-se imaginar que os elétrons de um átomo giraram em torno do núcleo em diversas órbitas circulares. Os elétrons cujas órbitas estão mais próximas ao núcleo são ligados mais fortemente a ele. Retirando-se um desses elétrons, o átomo fica instável e, rapidamente, outro elétron, que anteriormente estava livre ou situado em uma órbita mais externa, toma seu lugar. Nesse processo libera-se energia, que é emitida pelo átomo sob forma de radiação X. A frequência dessa radiação depende da estrutura atômica e da posição de onde provinha o elétron livre ou ligado que efetuou a troca (Matthews, 1977; Kendrew, 1961).

Átomos iguais emitem raios X de mesmo comprimento de onda quando o elétron próximo ao núcleo é extraído. As radiações emitidas possuem comprimentos de onda bem definidos, e não em toda a faixa, como é o caso da radiação de frenamento. Observa-se, então, que o espectro de emissão da radiação característica dos átomos é composto de diversas radiações distintas, de comprimentos de onda bem definidos, em contraposição ao espectro de radiação de frenamento, que é um espectro contínuo (Matthews, 1977).

Os raios-X são invisíveis, mas podemos detectá-los de três maneiras: primeiro, eles ionizam o ar e outros gases; por conseguinte, podemos usar um detector; segundo, por enegrecer os filmes fotográficos, do mesmo modo que a luz; terceiro, eles fazem alguns materiais fluorescer, ou seja, emitir luz.

Determinação da estrutura tridimensional

Após a obtenção de um cristal, este é colocado perante um feixe de raios X entre a fonte dos raios e um detector. O espaçamento dos átomos em uma grade cristalina pode ser determinado pelas medidas de localização e intensidades das manchas regulares denominadas reflexões, produzidas em filme fotográfico por um feixe de raios X de um

determinado comprimento de onda, após este ser difratado pelos elétrons dos átomos que constituem uma molécula (Kendrew, 1961; Branden & Tooze, 1991; Bella et al., 1994).

O espaçamento dos diferentes tipos de átomos em moléculas orgânicas complexas, mesmo as de tamanho muito grande como as proteínas, pode ser também analisado por métodos de difração de raios X, embora de forma bem mais trabalhosa do que para os cristais de sais simples. Quando o padrão repetitivo em um cristal é uma molécula tão grande como uma proteína, os numerosos átomos da molécula geram milhares de padrões de difração que devem ser analisadas por programas de computadores (Branden & Tooze, 1991; Bella et al., 1994).

As intensidades de difração máximas (intensidade dos pontos escuros no filme) são utilizadas para construir matematicamente uma imagem tridimensional da estrutura do cristal. Os raios X interagem quase exclusivamente com os elétrons na matéria, não com o núcleo atômico. Uma estrutura por raios-X é, portanto, uma imagem da densidade eletrônica do objeto em estudo. Um mapa de densidade eletrônica da proteína é reconstituído a partir do padrão global de difração utilizando-se técnicas matemáticas. Assim, um computador atua como uma lente computacional. Um modelo da estrutura consistente com o mapa de densidade eletrônica é, então, obtido. A **Figura 12** representa apenas uma pequena porção da informação total da difração disponível para o cristal de uma proteína pequena (Kendrew, 1961; Branden & Tooze, 1991; Bella et al., 1994).

As estruturas por raios-X de moléculas orgânicas pequenas podem ser determinadas com uma resolução da ordem de 1Å. Poucos cristais de proteínas possuem esse grau de organização. Além disso, nem todas as proteínas podem ser cristalizadas, ou seja, podem precipitar em arranjos tridimensionais ordenados. Os cristais de proteínas que são formados diferem dos da maioria das moléculas orgânicas pequenas por serem altamente hidratados; cristais de proteínas contêm normalmente um volume de 40 a 60 % de água (Rhodes, 1993; Kyte, 1995).

O grande conteúdo de solvente confere aos cristais de proteína uma consistência mole e gelatinosa, de forma que as moléculas são normalmente desordenadas em alguns poucos ângstroms. Isso limita sua resolução de 2 a 3,5 Å, embora uns poucos cristais de proteína sejam melhor coordenados (têm resolução mais elevada).

A resolução de poucos ângstroms é muito grosseira para revelar claramente a posição de átomos individuais, mas a forma do esqueleto polipeptídico pode, geralmente ser

traçada. As posições e as orientações das suas cadeias laterais podem, desse modo, serem deduzidas. Entretanto, uma vez que muitas cadeias laterais têm tamanho e formas semelhantes, o conhecimento da estrutura primária das proteínas é necessário para ajustar a seqüência de aminoácidos ao mapa de densidade eletrônica (Voet et al., 2000).

Outra consequência do grande conteúdo de águas nos cristais de proteínas é a manutenção da conformação nativa e funcional. De fato, o grau de hidratação de proteínas é semelhante ao da célula. Logo, as estruturas de cristalografia por raios-X de proteínas freqüentemente provêem uma base para o entendimento das suas atividades biológicas. As estruturas cristalinas têm sido utilizadas como pontos de partida para o desenvolvimento de fármacos que podem interagir especificamente com proteínas-alvo em condições fisiológicas (Kendrew, 1961; Branden & Tooze, 1991; Bella et al., 1994).

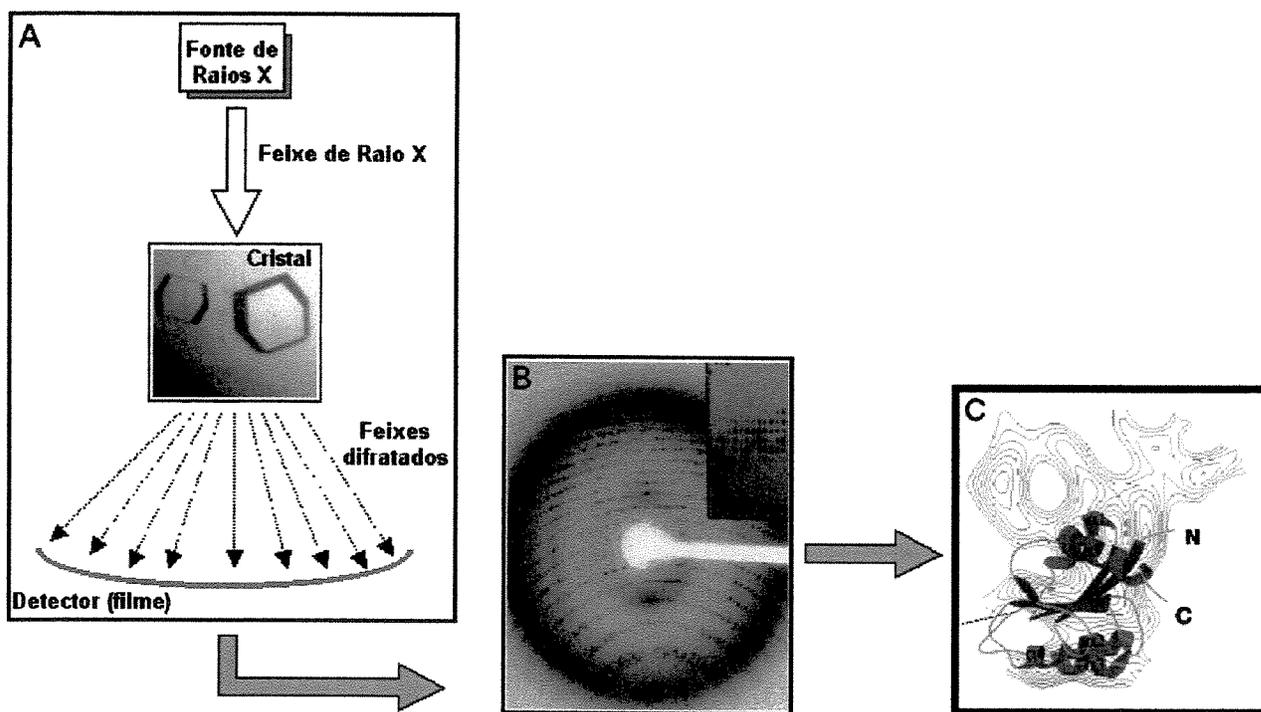


Figura 12 - A) Essência de uma análise cristalográfica com raios X: um feixe de raio X, cristal e um detector. B) Fotografia de precessão de raios X de um cristal. C) Mapa de densidade eletrônica.

CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR CTI

Os experimentos de cristalização e obtenção do modelo estrutural do inibidor CTI foram realizados a partir da valiosa colaboração com o grupo de Cristalização de Proteínas liderado pelo Prof^o Igor Polikarpov e sua aluna Sandra Krauchenco. O inibidor CTI foi cristalizado pelo método difusão de vapor em gota pendente a 18°C sistema “*hanging drop*” (McPherson, 1982).

Nesta técnica (Figura 13), uma gota de 2 a 10 μL da amostra de proteína foi misturada com o mesmo volume da solução de cristalização (geralmente tampão, sal e precipitante) e colocada em uma lamínula siliconizada. A lamínula foi então invertida e selada com graxa de silicone sob um reservatório contendo 500 a 1000 μL de solução de cristalização. A diferença de concentração entre a gota e o reservatório permitiu ao sistema atingir o equilíbrio por difusão, levando a formação de cristais.

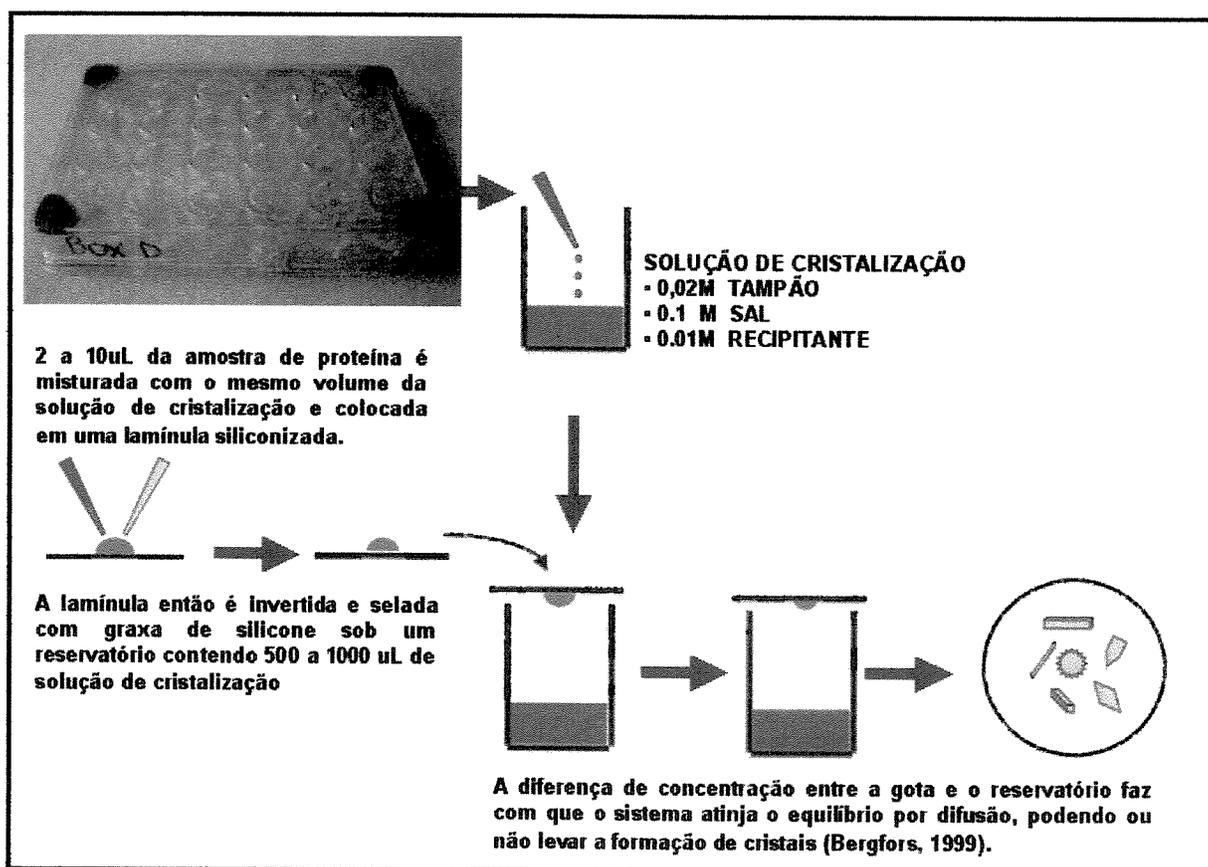


Figura 13 - Esquema do Método de difusão de vapor em gota pendente para a obtenção de cristais de proteínas.

As lamínulas utilizadas nesse trabalho foram primeiramente lavadas com água destilada e, após isso, deixadas por 3 minutos numa solução 2 % de silicone. Passado esse tempo, as lamínulas foram retiradas dessa solução e enxaguadas rapidamente em água. A secagem dessas lamínulas foi realizada com jato de ar comprimido. O inibidor foi dissolvido em tampão fosfato de potássio 25 mM em concentração final de 22mg/mL. Posteriormente, 10 μ L desta solução foi misturada com igual quantidade de PEG 6000 7,5 % em tampão fosfato de potássio 12 mM, cujo pH variou entre 5,4 e 6,3. Após centrifugação (4000 x g), por 5 minutos, gotas de 18 μ L da solução resultante foram equilibradas contra 1 mL num reservatório contendo 15 % de PEG 6000 em 100 mM do tampão fosfato de potássio, pH 6,0.

PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE CRISTAIS DE CTI

Os métodos tradicionais de preparação de derivados consistem em colocar o cristal nativo em uma solução de baixa concentração de átomos pesados (normalmente em torno de 5 mM) por um período prolongado de tempo (normalmente horas ou mesmo dias). Assim, espera-se que apenas alguns sítios de ligação específicos sejam preenchidos pelos átomos pesados. Muitas vezes durante este processo, os cristais são afetados e não resistem, não sendo utilizados para a coleta.

Para o inibidor CTI aplicou-se o método chamado “*quick cryo soaking*” (Nagem et al., 2001), onde o processo de derivatização é acelerado, pois ao invés de usar uma baixa concentração de átomos pesados na solução de derivatização, esta concentração foi aumentada algumas ordens de grandeza (utilizou-se em torno de 0,25-1,0 M). O cristal foi deixado por um período de tempo bem menor nesta solução (cerca de 15-300 segundos foram suficientes para a incorporação dos átomos pesados).

Os cristais submetidos à derivatização foram preparados pelo método de difusão a vapor em gota pendurada, usando o segundo lote de inibidor purificado e liofilizado. Os cristais adequados à preparação de derivados foram crescidos a 291 °K em 0,1 M de tampão acetato de sódio com pH entre 4 e 4,5 usando PEG 4000 20-25 % como precipitante. As gotas consistiam de iguais volumes de proteína a 10 mg/mL e solução do poço.

COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

Dois procedimentos de coletas dos cristais poderiam ser realizados: coleta com capilar e coleta Cryo-data (crio-cristalização). Na primeira coleta utiliza-se um capilar de quartzo 0,8 mm de diâmetro. Um adaptador flexível (pequeno tubo de borracha) é acoplado a ele e a uma seringa (3 mL). Com auxílio de um esteriomicroscópio, o cristal é visualizado e coletado pelo capilar, por diferença de pressão. Na técnica de crio-cristalização, *crioloops* de 0,2-0,3 mm embebidos em solução de cristalização com 5 % de glicerol são utilizados para a coleta do cristal. O glicerol atua como agente protetor do cristal quando este entra em contato com o nitrogênio. Ele impede que se formem cristais de água, pois estes podem atuar na difração dos raios-X causando erros na interpretação dos dados.

Foram coletados dados para um cristal nativo montado num *loop* de *rayon*, imerso por 30 segundos numa solução crio protetora (20% etileno glicol misturado no líquido mãe) e rapidamente congelado a 80 °K no feixe de nitrogênio. Preparou-se um derivado com césio e outro com iodo usando a técnica “*quick cryo soaking*” que também foram coletados. Toda a coleta dos dados de difração foi feita na linha de Cristalização de Proteínas (Polikarpov et al., 1998, Polikarpov et al., 1997) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-Brasil), usando uma placa de imagem MAR345. Os dados foram auto-indexados e integrados com o programa Scalepack (Otwinowski, 1993). A incorporação dos átomos pesados dentro do cristal foi inicialmente checada através da análise do sinal anômalo.

DETERMINAÇÃO DA SUBESTRUTURA DOS ÁTOMOS PESADOS

Após a coleta dos dados de difração, a próxima etapa é determinar para cada derivado, a posição ou a subestrutura dos átomos pesados. Para isso, utiliza-se o sinal anômalo presente no conjunto de dados ou pode-se comparar cada derivado como o cristal nativo e usar as diferenças isomorfas para estimar a posição dos átomos pesados. Foram usadas as diferenças anômalas para a determinação das posições dos átomos pesados. Para isso, analisa-se a quantidade em função da resolução para cada derivado. As diferenças anômalas normalizadas foram calculadas com o programa DREAR (Blessing & Smith, 1999).

Essas diferenças anômala foram usadas dentro do programa SnB (Weeks & Miller, 1999) para a determinação da subestrutura dos átomos de césio e de iodo. Foram localizados 7 átomos de césio e 4 átomos de iodo sendo todos estes sítios com densidade eletrônica acima de 10 sigmas.

DETERMINAÇÃO DAS FASES DOS FATORES DE ESTRUTURA

As posições dos átomos pesados encontrados pelo programa SnB foram inicialmente refinadas usando alguns dos programas do pacote CNS (Brünger et al., 1998), sendo usados mapas de diferença anômala e isomorfa no refinamento. Essas posições refinadas foram usadas para a determinação das fases dos fatores de estrutura utilizando o programa SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997).

CONSTRUÇÃO AUTOMÁTICA DO MODELO

O mapa de densidade eletrônica obtido para o cristal nativo usando a técnica de MIRAS foi submetido à modificação de densidade eletrônica com o programa SOLOMON (Abrahams, 1997). Essa modificação de densidade eletrônica foi feita com o objetivo de melhorar a qualidade e a interpretação visual do mapa. O novo mapa é usado para a construção automática do modelo usando o programa wARP (Perrakis et al., 1997). Utilizou-se um total de 20 ciclos de construção automática no modo “*warpNtrace*” e nos últimos ciclos, cerca de 92 % da estrutura foi traçada em 6 cadeias.

AJUSTE MANUAL DO MODELO

Após a construção automática do modelo, alguns ajustes foram necessários para corrigir alguns erros no modelo inicial. Em algumas posições construídas como uma serina pelo programa, pode se ver a presença de vários átomos de oxigênio, sugerindo que esse resíduo é na verdade uma fenilalanina. Estes tipos de erros podem e devem ser confirmados

através da construção de um mapa de diferença anômala que mostre se existe a presença dos átomos de enxofre nessa ligação. Isso é possível, pois o enxofre pode ser considerado um átomo pesado quando comparado ao carbono ou nitrogênio.

Assim, fez-se necessário a substituição dos resíduos cuja densidade eletrônica foi diferente de glicina, alanina ou serina. Além disso, também foram construídos alguns *loops*, cuja presença foi indicada pela interpretação dos contornos do mapa de densidade eletrônica e que estariam conectando algumas cadeias. Esses ajustes, construção e definições de cadeias laterais, foram feitos manualmente usando um programa gráfico (Jones et al., 1990), para a interpretação visual do mapa de densidade eletrônica.

Dessa forma, toda a seqüência de aminoácidos foi sendo substituída através da interpretação visual da densidade eletrônica e a primeira estimativa da composição prevista foi comparada entre a seqüência primária determinada bioquimicamente usando eletroforese bidimensional, espectrometria de massas MALDI-TOF e ESI-QTOF.

04. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA

A atividade inibitória foi acompanhada nos estudos de interação de CTI com a protease tripsina de acordo com método previamente descrito por Silva et al. (2001). As amostras foram submetidas a um ensaio para se determinar a porcentagem de inibição da tripsina. O inibidor foi pré-incubado com tripsina já titulada por 20 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, adicionou-se 1 mL da solução de BAPNA (0,1 M), previamente dissolvido em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), sendo a incubação prosseguida por mais 20 minutos a 37 °C.

A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30 % (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente em 405 nm, com a finalidade de estimar a atividade residual da tripsina no ensaio. As constantes de inibição da serinoproteinase (tripsina) empregada no estudo com as subunidades e o inibidor CTI de

Copaifera langsdorffii, foram calculadas assumindo-se o mecanismo de inibição do tipo "slow tight-binding" (Morrison, 1982). Os dados foram analisados no programa ENZIFITTER.

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE CTI COM A PROTEASE TRIPSINA

Um estudo estequiométrico de CTI foi realizado visando entender o comportamento do inibidor na formação de complexo com a enzima tripsina. Soluções com atividade inibitória foram analisadas por filtração em gel em coluna de Superdex 200 no sistema FPLC, equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0, NaCl 0,01 M, sob fluxo de 0,3 mL/min. No complexo binário, 0,25 mg de CTI foi incubado com 0,25 mg de tripsina em 0,2 mL de tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, por 30 minutos, a 37 °C. A mistura de proteína supracitada foi submetida a uma cromatografia na coluna prontamente equilibrada como mencionado acima. Os picos provenientes da cromatografia do complexo CTI + Tripsina foram coletados e submetidos à análise em gel de eletroforese Tricina-SDS como descrito anteriormente nas páginas 23 e 24. A massa molecular relativa da proteína inibitória CTI, da tripsina e do complexo inibidor-protease foi determinada por comparação com os seguintes marcadores de massa molecular: BSA (66 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Lisosima (14 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa).

EFEITOS DE REAGENTES MODIFICADORES NA ATIVIDADE DO INIBIDOR CTI

A inibidor CTI foi pré-incubado na presença de modificadores químicos na concentração de 10 mM, tais como, fenilglioxal (PGO), N-etilmaleimida (NEM), ácido iodoacético (IAA), N-bromosuccinamida (NBS) e N-acetilimidazol (NAI), preparados frescamente em 200 µL de tampão A (300 mM de manitol e 20 mM de Hepes-Tris pH 7,5), por 30 minutos, à 25 e 37 °C, de acordo com o método de Boivin et al. (1997). Modificadores como dietil-pirocarbonato (DEPC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foram utilizados em 200 µL de tampão B (300 mM de manitol e 20 mM de MES-NaOH pH 6,0), por 30 minutos, a 37 °C.

Os modificadores DEPC e DCCD continham etanol na concentração final de 1,5%. Estudos preliminares mostraram que o etanol, na concentração utilizada, não apresentava efeito na atividade da enzima tripsina e do inibidor CTI. A reação foi paralisada após diluição de 50 vezes.

ALTERAÇÃO FUNCIONAL – ESTUDOS CINÉTICOS

Nos estudos de mapeamento dos resíduos de aminoácidos importantes na estabilidade conformacional e funcional de CTI, a atividade inibitória foi acompanhada de acordo com método descrito anteriormente nas páginas 50-51. As amostras foram submetidas a um ensaio para determinar a porcentagem de inibição da tripsina. Uma concentração quatro vezes superior ao IC₅₀ de CTI foi utilizada em todos os ensaios, de forma a diluir e diminuir a ação dos agentes modificadores na atividade da enzima tripsina.

ALTERAÇÃO ESTRUTURAL – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

A intensidade de fluorescência intrínseca do inibidor CTI nativo e modificado pelos compostos acima, foi monitorada em cubetas de quartzo de 1 cm, em espectrofluorímetro Hitachi 2000 com comprimento de onda de excitação de 293 nm e de emissão de 298 a 450 nm. A largura da fenda foi de 5 nm. As medidas de fluorescência foram realizadas a uma temperatura ambiente.

05. ESTABILIDADE FUNCIONAL E CONFORMACIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)

CONCEITOS FUNDAMENTAIS DE DICROÍSMO CIRCULAR E FLUORESCÊNCIA

As proteínas apresentam várias propriedades biofísicas que podem ser analisadas através da interação com ondas eletromagnéticas e pela interação da proteína com o meio solúvel no qual ela se encontra. Para a realização desta parte da tese, foram avaliadas algumas propriedades biofísicas da proteína CTI em solução, caracterizando-se a relação estrutura-estabilidade-função. A seguir, é apresentada uma breve introdução teórica sobre as técnicas utilizadas.

Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular detecta a atividade óptica de moléculas quirais originadas pela interação de centros assimétricos com a luz circularmente polarizada. Este fenômeno é representado pela diferença de absorção entre a luz polarizada à direita e à esquerda. No estudo de proteínas e peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de dicroísmo são: a ligação amida, os resíduos aromáticos, triptofano, tirosina e fenilalanina e as pontes dissulfeto (Mulkerrin, 1996).

O Dicroísmo Circular (CD) é um indicador sensível da conformação da cadeia principal das proteínas, representando uma expressão da atividade óptica. As proteínas são opticamente ativas porque são dissimétricas, isto é, não podem ser superpostas a suas imagens especulares. Dois tipos de dissimetria estão presentes: de configuração e de conformação (Woody, 1995; Kelly & Price, 1997).

Os radicais de aminoácidos, que não a glicina, têm atividade óptica intrínseca devida à configuração L em torno de seu átomo de carbono α . A treonina e a isoleucina possuem mais de um centro assimétrico. Interações de elétrons entre diferentes radicais em uma proteína também contribuem para a atividade óptica. O sentido dextrorso de uma α -hélice, por exemplo, dá origem a uma grande contribuição da conformação à atividade óptica (Woody, 1995). Os coeficientes de absorção para luz polarizada circularmente para a esquerda e para a direita serão diferentes se os elétrons que participam na transição, para o

estado excitado, sentirem um ambiente dissimétrico. Essa expressão da atividade óptica é chamada de dicroísmo circular (Kelly & Price, 1997).

O espectro de CD no ultravioleta distante, para uma proteína, é sensível à conformação de cadeia principal. A região informativa está entre 170 e 240 nm, onde o grupamento amida peptídico tem múltiplas faixas de absorção superpostas. Medidas de polipeptídios sintéticos e de proteínas com estrutura conhecida definiram os espectros de CD de α -hélices, temas de estrutura β , e cadeias de conformação aleatória. A α -hélices faz uma contribuição dominante, com suas faixas de CD negativo a 208 e 222 nm, e com sua faixa positiva a 192 nm (Woody, 1995; Kelly & Price, 1997).

Uma cadeia polipeptídica com arranjo aleatório, em contraste, tem uma faixa de CD negativo centrada em 199 nm. Estimativas do conteúdo em α -hélices de proteínas, deduzidas do espectro de CD, concordam com os valores obtidos de estudos cristalográficos com raios X. O conteúdo de estrutura β também pode ser avaliado com espectros de CD, mas a incerteza é maior porque as estruturas β são menos regulares do que as α -hélices e contribuem menos para o espectro de CD. Na **Figura 14** estão apresentados os espectros de dicroísmo circular das estruturas secundárias mais comuns (Greenfield & Fasman, 1969).

Aplicação do Dicroísmo Circular

Utilizando esta técnica pode-se obter informações sobre as características estruturais secundárias das proteínas, assim como, realizar um estudo de forma a compreender o arranjo conformacional e elucidar mecanismo físico-químico do enovelamento de proteínas. O dicroísmo circular permite estudar variações na estrutura secundária, ocasionada por alguns fatores como: pH, temperatura e agentes redutores e caotrópicos (Genov et al., 1997).

Artigos têm utilizados o espectro de CD no estudo de interações proteínas-carboidratos, sendo possível, por exemplo, determinar a concentração de carboidrato que inibe a atividade hemaglutinante de lectinas de serpentes e plantas. Gurjar et al. (1998) observaram por estudo de modificações químicas, no CD, que os resíduos de lisina e tirosina são essenciais para a ligação específica e reversível de carboidratos nas lectinas e que as modificações destes resíduos provocam alterações na estrutura da lectina e conseqüentemente na atividade.

O Dicroísmo Circular vem sendo utilizado nos estudos de mutações dirigidas, onde os espectros fornecem informações sobre a estrutura secundária e sua estabilidade diante da substituição de aminoácidos específicos Greenfield (2004), avaliaram a contribuição dos resíduos aromáticos para a atividade biológica das proteínas, por intermédios de mutantes e sugerem que os resíduos de Trp 120 e Trp 68 têm maior contribuição na atividade da interleucina 1 β .

Os espectros de CD também são importantes para se estudar o enovelamento das proteínas, uma vez que, se conhece muito sobre estrutura primária, terciária e quaternária de proteínas, mas pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual as proteínas se enovelam. Desta forma, o espectro de CD tem sido muito utilizado para examinar a renaturação das proteínas frente à desnaturação, por cloreto de guanidina, uréia entre outros agentes caotrópicos (Woody, 1995; Kelly & Price, 1997).

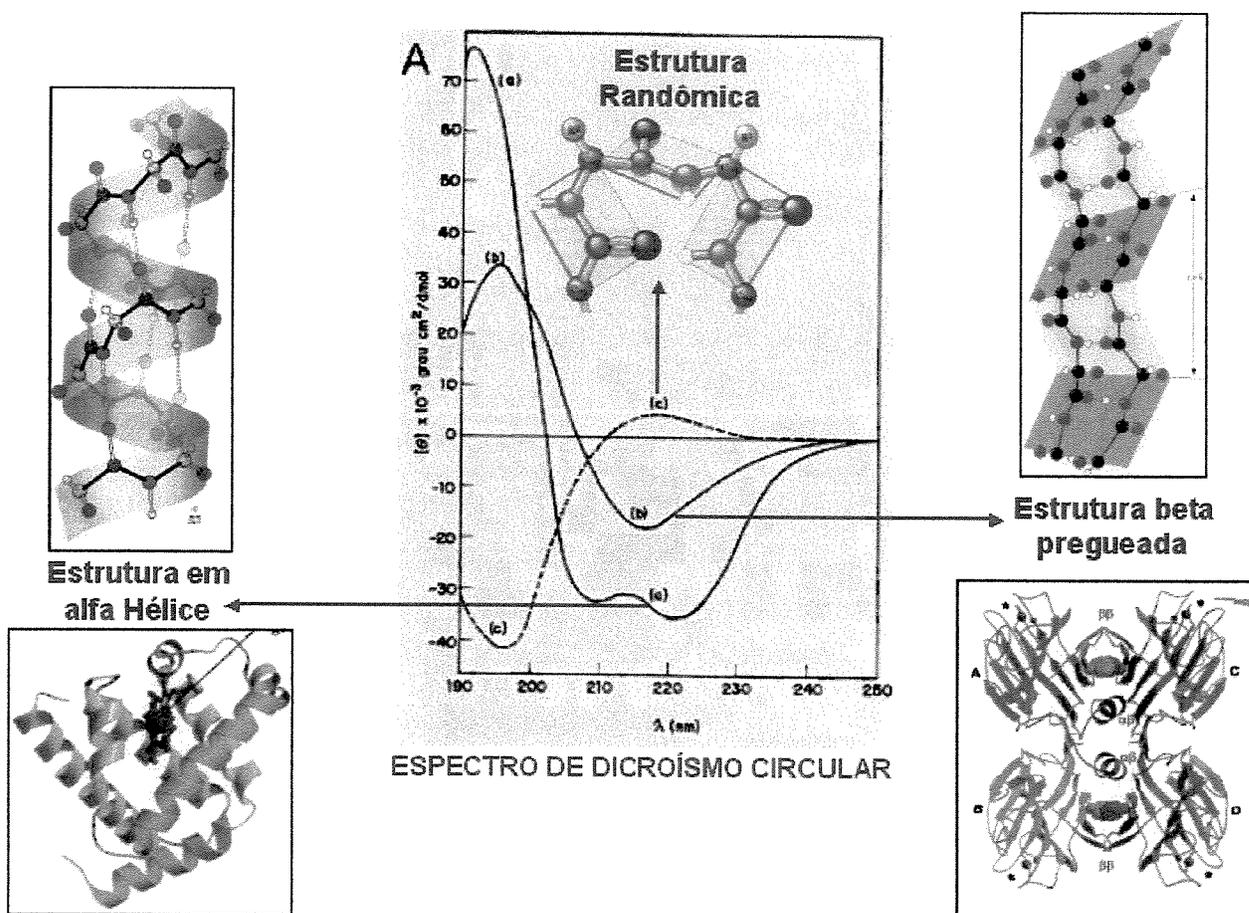


Figura 14 - Espectros de dicroísmo circular das estruturas secundárias (a) α -hélice, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica (Adaptado de Greenfield & Fasman, 1969).

Fluorescência

A Fluorescência é uma técnica espectrofotométrica baseada em um fenômeno quântico no qual um elétron de um determinado cromóforo, após absorver determinada quantidade de energia, atinge um estado excitado e ao retornar ao seu estado fundamental, emite parte da energia absorvida na forma de luz. O restante da energia absorvida pelo cromóforo pode ser perdida no retorno dos elétrons excitados em outros processos que a emissão de radiação eletromagnética como: calor ou processos químicos e vibracionais. Desta forma, a quantidade de energia emitida na forma de ondas eletromagnéticas é relativamente inferior à energia absorvida (energia de excitação) e λ da luz emitida é maior do que aquele da luz absorvida.

Naturalmente, existem 3 aminoácidos, em proteínas, suscetíveis ao fenômeno de fluorescência. São eles: principalmente triptofano, tirosina e em menor escala fenilalanina. Porém, é possível utilizar sondas fluorescentes ligadas a determinados aminoácidos ou compostos que emitem fluorescência quando estes interagem com a proteína (Lakowicz, 1983). O aminoácido triptofano é sensível ao ambiente no qual ele se encontra, apresentando diferentes características fluorescentes que são dependentes do grau de exposição ao solvente hidrofílico ou regiões hidrofóbicas da proteína. Assim, aliado ao seu alto rendimento quântico, sua baixa frequência em proteínas e possibilidades de excitação específica, a técnica de fluorescência do triptofano tornou-se uma das mais utilizadas em biofísica molecular, principalmente em estudos relacionados a mudanças conformacionais de proteínas.

Quando o resíduo de triptofano se encontra bem exposto ao solvente, há um maior gasto de energia no estado excitado com a reorganização das moléculas de água que o envolvem e emite fluorescência em λ menos energéticos (próximos a 355 nm). Já quando o resíduo de triptofano se encontra em uma região do interior da proteína, geralmente hidrofóbico e com baixa acessibilidade à água, a emissão de fluorescência ocorrerá em λ mais energético (310 nm a 335 nm), pois não haverá grande perda de energia com a reorganização de moléculas de água. A mudança de exposição do triptofano ao ambiente pode ser induzida por desnaturante ou ligantes e fornecem informações sobre a estabilidade e também sobre as mudanças conformacionais sofridas pela proteína (Lakowicz, 1983).

Os principais λ de excitação para o triptofano, tirosina e fenilalanina estão no intervalo entre 260 e 295 nm. Porém, é possível separar bem as contribuições nos espectros de emissão entre o triptofano e tirosina. Utilizando λ de excitação próximo a 260 nm é possível excitar principalmente resíduos de tirosina e em 295 nm os resíduos de triptofano serão preferencialmente excitados. Se uma determinada proteína possui apenas tirosina, o máximo de emissão de fluorescência se encontra em torno de 305-310 nm no estado nativo e 335 no estado desnaturado (dependendo da exposição das tirosinas ao solvente). Porém, o rendimento quântico da fluorescência do triptofano é maior que para as tirosinas. Assim, dependendo da proporção destes fluoróforos e da proximidade entre eles, é possível observar comportamentos diferenciados do espectro de emissão, tais como: supressão de fluorescência, deslocamento do máximo de emissão ou mudanças no centro de massa espectral de fluorescência. A acessibilidade do solvente ao triptofano, e em menor escala à tirosina, também podem ser determinadas utilizando agentes supressores de fluorescência como iodetos e acrilamida entre outros.

DETERMINAÇÃO CONFORMACIONAL POR DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco 5.500, em colaboração com o Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine do Instituto de Química (UNICAMP). A medida da rotação óptica foi calibrada com ácido (d)-10-ácido-canforsulfônico. Os espectros foram adquiridos entre 190 e 250 nm, a cada 0,5 nm, com uma velocidade de 50 nm/min, com número variado de acumulações. As celas utilizadas foram de 0,02 cm de caminho óptico. De todos os espectros foi subtraído o branco correspondente. Os valores de $[\theta]$ são dados em elipticidade molar residual ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{res}^{-1}$) e foram calculados a partir da **Equação 1**.

$$[\theta] = m\text{deg} / (10.c.n.l) \quad (1)$$

onde **c** representa a concentração molar, **n** o número de resíduos e **l** o caminho ótico em cm.

Software J-500 fornecido pela Jasco Company foi usado para calcular os dados obtidos por Dicroísmo Circular. Gás Nitrogênio foi continuamente purgado no aparelho Jasco

antes e após os experimentos. A média dos valores da elipticidade dos resíduos foi calculada usando o valor de 110 Da, que é a média da massa molecular para os resíduos de aminoácidos. O conteúdo da estrutura secundária das proteínas foi determinado pelo programa CD PROT, por combinação linear, tendo por base o espectro de referência de proteínas que apresente sua estrutura terciária conhecida em banco de dados.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE CTI

A atividade inibitória foi acompanhada nos estudos de estabilidade conformacional e funcional de CTI de acordo com método descrito anteriormente na página 50-51. As amostras foram submetidas a um ensaio para se determinar a porcentagem de inibição da tripsina. Concentrações quatro vezes superior ao IC₅₀ de CTI foram utilizadas em todos os ensaios, de forma diluir e diminuir a ação dos agentes desnaturantes (DTT, pH, temperatura e agentes caotrópicos) na atividade da enzima tripsina.

EFEITO DO DITHIOTHREITOL (DTT)

Alteração Estrutural - Gel Filtração e Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS Tricina

As alterações estruturais ocasionadas por DTT, na concentração final de 1 mM, foram avaliadas em cromatografia de gel filtração. A massa molecular relativa de CTI foi determinada por HPLC Water, utilizando uma coluna de filtração em gel Proteinpack SW-300 equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, 100 mM de NaCl pH 7.6, sob fluxo de 0,5 mL/min. Os seguintes marcadores de massa molecular foram utilizados: Blue Dextran (200.000 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsina Bovina (24 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa). Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Tricina, descrito anteriormente nas páginas 23-24, foi utilizado na determinação de alterações estruturais nas subunidades do inibidor CTI após o tratamento com o redutor DTT.

Alteração estrutural – Medidas de Fluorescência

A intensidade de fluorescência intrínseca do inibidor CTI nativo e reduzido com DTT (1, 10 e 100 M) após 120 minutos foi monitorada em cubetas de quartzo de 1 cm, em espectrofluorímetro Hitachi 2000 com comprimento de onda de excitação de 293 nm e emissão de 298 a 450 nm. A largura da fenda foi de 5 nm. As medidas de fluorescência foram realizadas à temperatura ambiente.

Alteração Funcional – Estudos Cinéticos

O efeito do DTT na atividade de CTI foi avaliado de acordo com o método descrito por Ramasarma et al. (1995). CTI (0,5 mg/mL) foi diluído em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,7 e tratado com DTT (nas concentrações finais de 1, 10 e 100 mM). A reação foi interrompida por iodoacetamida duas vezes a concentração final de DTT. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo específicos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos) e dialisados contra tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 por 2 horas. Estas amostras foram ensaiadas contra tripsina e quimotripsina como descrito acima.

EFEITO DO pH EM TEMPERATURAS DISTINTAS

A estabilidade do inibidor CTI foi checada em 5 valores de pH. O inibidor (0,1 mg) foi pré-incubado em tampões apropriados. Foram utilizados como tampões: KCl-HCl 0,05 M pH 2, acetato de sódio 0,05 M pH 4, 6 Tris-HCl 0,05 M, pH 8 e 10 de acordo com Terada et al., 1994. Para cada valor de pH variou-se a temperatura nos intervalos de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 °C. A atividade inibitória de CTI foi avaliada após a concentração do material concentrada em *Speed Vac Plus*. A atividade foi determinada como descrito inicialmente em métodos e foram realizados em triplicatas para diminuir a margem de erro.

EFEITOS DOS AGENTES CAOTRÓPICOS

Desnaturação por Uréia

A solução estoque de uréia foi preparada numa concentração de 9 M em tampão Tris-HCl 0,1 M DTT 1 mM pH 8,0 a fim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 8 M. O inibidor CTI ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi equilibrado por 24 h a 37 °C nas diferentes concentrações de uréia e mantida em banho a 37 °C durante o experimento. As intensidades de fluorescência intrínseca do inibidor foram monitoradas em espectrofluorímetro Hitachi 2000 com comprimento de onda de excitação de 293 nm e emissão de 298 a 450 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm e largura da fenda de 5 nm.

Desnaturação por Cloreto de Guanidina

A solução estoque de cloreto de guanidina foi preparada numa concentração de 8 M em Tris-HCl 0,1 M DTT 1 mM pH 8,0 a fim de se obter, por diluição, concentrações de 0 a 6 M. A enzima ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi equilibrada por 55 h a 4 °C nas diferentes concentrações de cloreto de guanidina e mantida a 37 °C durante o experimento. As intensidades de fluorescência intrínseca do inibidor foram monitoradas de acordo com o método descrito anteriormente.

Renaturação

A renaturação do inibidor CTI foi checada pela determinação da porcentagem de inibição da protease tripsina após a diluição ou diálise por até 6 horas do inibidor tratado com uréia 8 M ou guanidina 6 M. A renaturação do inibidor CTI foi acompanhada por medidas de fluorescência e pela determinação da atividade inibitória de alíquotas de CTI em diálise por vários intervalos de tempo.

CÁLCULOS DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

Dos espectros provenientes de fluorímetro tanto para uréia quanto para cloreto de guanidina foram utilizadas para o cálculo de parâmetros para avaliar a estabilidade conformacional de inibidor de tripsina CTI.

Centro de Massa

As intensidades de fluorescência obtidas no espectro de emissão foram utilizadas para calcular o centro de massa de acordo com o método descrito por Bonafé et al. (1998).

Fração de Proteína Desnaturada

A fração de proteína desnaturada representa o percentual de inibidor desnaturado em função da concentração de um agente caotrópico, e é um parâmetro termodinâmico somente calculado em processos de desnaturação reversíveis que envolvam dois estágios, nativo e desnaturado. Este parâmetro foi calculado utilizando o método de Pace (1990). Assim, a fração de proteína desnaturada (CTI), F_d , foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$F_d = (y_n - y_{obs}) / (y_n - y_d)$$

onde y_{obs} é a intensidade de fluorescência observada, e y_n e y_d representam os valores de y característicos à conformação nativa e desnaturada, obtidos de acordo com Pace (1990).

Energia Livre (ΔG)

A diferença de energia livre entre o estado nativo e desnaturado (ΔG) foi calculada através da fórmula abaixo:

$$\Delta G = -R T \ln [F_d / (1 - F_d)]$$

onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal mol}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin. Em geral, a variação de energia livre é linear em relação à concentração do desnaturante. O método de análise dos mínimos quadrados foi usado para demonstrar os valores da região de transição pela equação:

$$\Delta G = \Delta G (H_2O) - m [D]$$

onde $\Delta G (H_2O)$ é o valor de ΔG na ausência do desnaturante, m é o intercepto da transição desnaturante (representa a inclinação das retas), ou seja, a medida da dependência do ΔG em relação à concentração do desnaturante, e $[D]$ é a concentração do desnaturante.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

01. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS ISOFORMAS DO INIBIDOR DE TRIPSINA CTI

MASSA MOLECULAR DAS SUBUNIDADES DE CTI

O inibidor CTI da serinoprotease tripsina extraído e purificado segundo Silva et al. 2001 foi analiticamente cromatografado (HPLC) em coluna de fase reversa C18 em dois picos (CTI-I e CTI-II) indicando que CTI apresenta estrutura tridimensional constituída por duas cadeias polipeptídicas. Cada pico apresentou-se como uma banda única em gel SDS Tricina (Figura 01a e b). Essas subunidades apresentaram massa molecular aparente de aproximadamente 11 e 9 kDa, respectivamente, em condições reduzidas com DTT 0.1 M. A eletroforese em condições não desnaturantes mostrou três bandas sugerindo, inicialmente, pelo menos três isoformas para o inibidor CTI (Figura. 01 c).

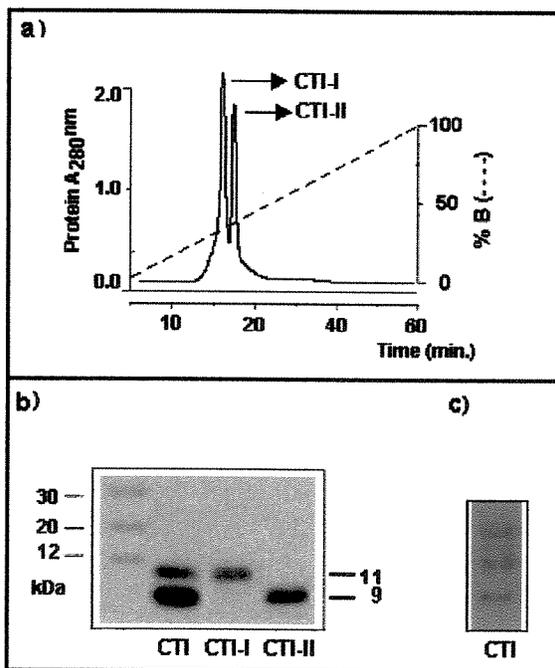


Figure 01 - Perfil de eluição do inibidor CTI em uma coluna C18 e gel de eletroforese. **a)** A coluna de C18 (3,9 x 300 mm) foi equilibrada em solução de TFA 0,1 % (Solvente A). Amostra aplicada: 1 mg de CTI obtido em coluna de afinidade. Solvente A: TFA 0,1 %, Solvente B Acetonitrila 66 % em TFA 0,1 %. Fluxo 1 mL/min. Absorbância em 280 nm. **b)** Eletroforese em gel de Tricina (16,5 %) em SDS da fração CTI, e das subunidades CTI-I e CTI-II provenientes da coluna de fase reversa. **c)** Gel de eletroforese em condições não desnaturantes de CTI, indicando microheterogeneidade.

ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DE CTI-I E CTI-II

A Figura 02 evidencia a seqüência N-terminal das subunidades de CTI (CTI-I e CTI-II), onde nenhuma similaridade foi observada entre as subunidades de CTI. A porção N-terminal da subunidade CTI-I mostrou considerada similaridade com inibidores da família tipo Kunitz. Já CTI-II não apresentou homologia seqüencial significativa com a extremidade N-terminal de outros inibidores descritos, porém, uma análise cuidadosa desta seqüência N-terminal com porções internas dos inibidores de Kunitz, evidenciaram uma discreta similaridade, como pode ser visualizado na figura abaixo.

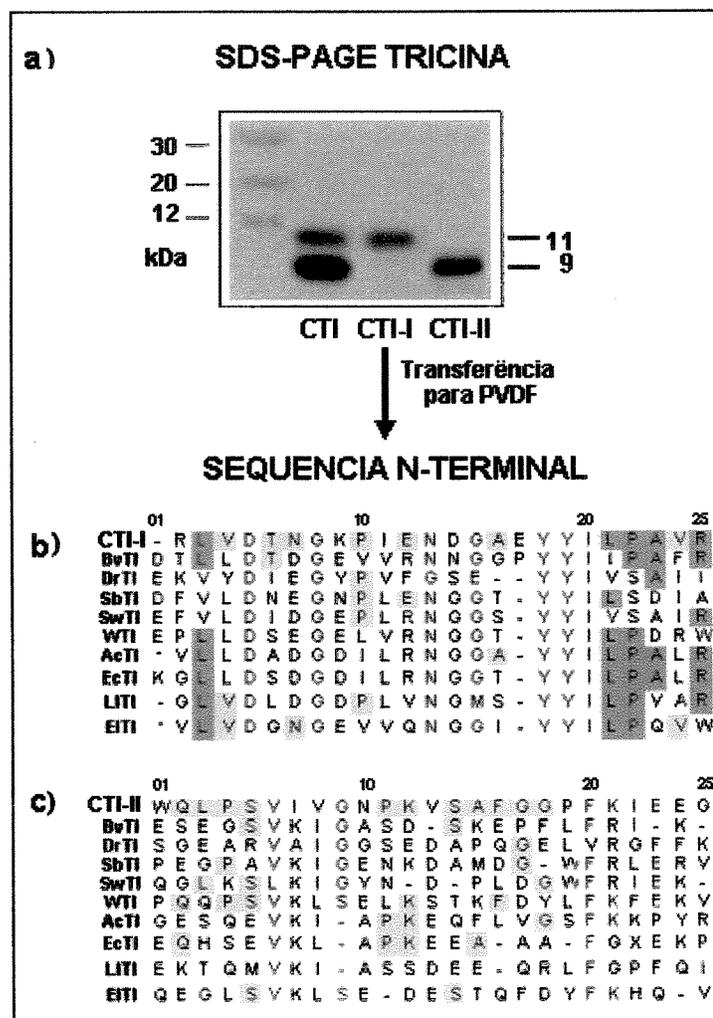


Figura 02 - a) Eletroforese em gel de Tricina (16,5%) em SDS das subunidades CTI-I e CTI-II provenientes da fase reversa. b) Análise da homologia comparativa da região N-terminal de CTI-I com outros inibidores de tripsina tipo Kunitz. c) Análise da homologia comparativa da região N-terminal de CTI-II com outros inibidores de tripsina tipo Kunitz.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS SUBUNIDADES DE CTI

A espectrometria de massas foi utilizada para determinar o número de isoformas e a massa molecular acurada destas. Os espectros de massas (MALDI-TOF) das subunidades do inibidor CTI purificadas em cromatografia de fase reversa em coluna C-18 (HPLC) de acordo com Silva et al. 2001, encontram-se representados nas **Figuras 03 e 04**. Observou-se uma microheterogeneidade tanto para CTI-I quanto para CTI-II com maior intensidade os picos de massa 10.719 e 8.244 respectivamente.

Em b das **Figuras 03 e 04** observa-se que CTI apresenta aproximadamente 7 e 8 isoformas para CTI-I e CTI-II respectivamente. CTI-I representa uma mistura das isoformas a, b, c, d, e, f e g com a e g diferenciando em 722.44 Da. Para CTI-II foi possível identificar pelo menos 8 isoformas designadas por h, i, j, k, l, m, n e o, onde se observa entre as isoformas h e o uma distinção de massa igual a 661.28 Da.

O espectro de CTI obtido no espectrômetro de massa ESI-QTOF (**Tabela 01**) relevou muitos íons carregados localizados na faixa de massa m/z de 400-1600. A massa média do pico principal foi 10781.97 e de 8593.37 para CTI-I e CTI-II, respectivamente. Tais resultados evidenciaram uma microheterogeneidade considerável para o inibidor CTI, sendo constituído de várias isoformas.

Tabela 01 - Massa molecular dos componentes de CTI por espectrometria de massa em Q-TOF.

Isoformas	Massas	
	Subunidades	
	CTI - I	CTI - II
<i>a</i>	10647.78	8152.66
<i>b</i>	10713.09	8173.83
<i>c</i>	10730.93	8431.04
<i>d</i>	10763.88	8506.06
<i>e</i>	10781.97	8518.11
<i>f</i>	10797.35	8574.80
<i>g</i>	10868.94	8593.37
<i>h</i>	10884.70	8819.09
<i>i</i>	10955.54	8922.87

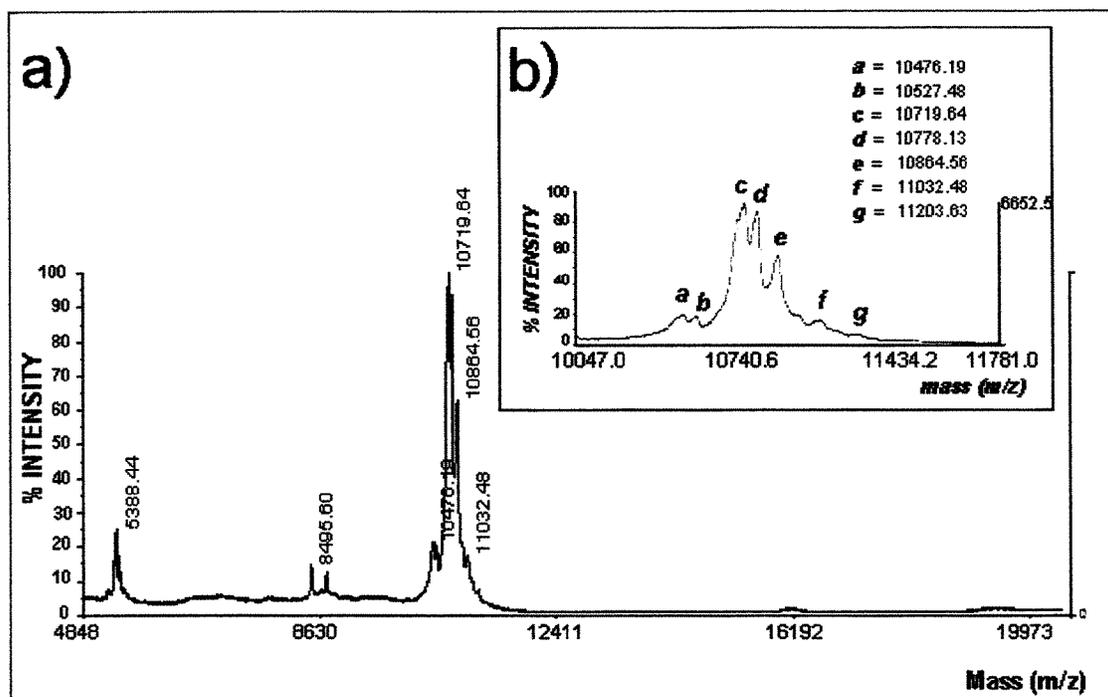


Figura 03 - a) Perfil do espectro da fração CTI-I por espectrometria de massas MALDI-TOF. b) Melhor visualização das isoformas em um zoom entre 10047.0 a 11781.0 (m/z).

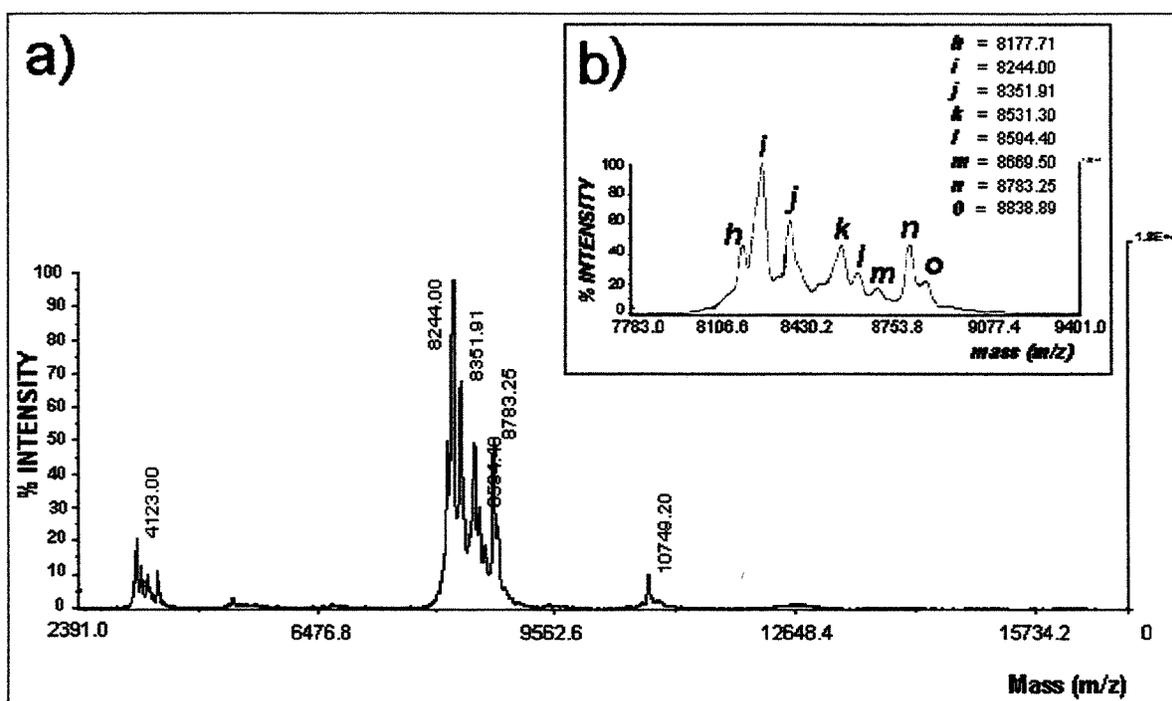


Figura 04 - a) Perfil do espectro da fração CTI-II por espectrometria de massas MALDI-TOF. b) Melhor visualização das isoformas em um zoom entre 7780.0 a 9401.0 (m/z).

DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE CISTEÍNAS EM CTI

A presença e quantidade de resíduos de cisteínas nas subunidades de CTI foram avaliadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF) após a redução e S-carboxiamidometilação de CTI nativo com iodoacetamida. Antes do tratamento, dois picos principais de massa molecular de 10754.3 e 8519.4 (**Figura 05**) foram detectados para CTI. Quando CTI foi tratado somente com iodoacetamida, não foi registrada nenhuma alteração no espectro de massa, indicando a ausência de resíduos de cisteínas livres na molécula.

A análise do espectro de massa no espectrômetro MALDI-TOF, após a redução e carboxiamidometilação, detectou dois picos de massas 10870.3 e 8519.4. Essa diferença de massa, de 116 ± 1 Da (**Figura 05**), sugere fortemente um aumento de massa de 58 Da para cada resíduos de cisteína que estavam formando uma ponte dissulfeto na estrutura protéica da subunidade CTI-I reduzida e alquilada com iodoacetamida.

O espectro do MALDI-TOF permite ainda inferir a ausência de cisteínas, estabelecendo pontes dissulfeto na subunidade de CTI-II (que tem massa de 8519.4 Da), independentemente de nativa ou reduzida.

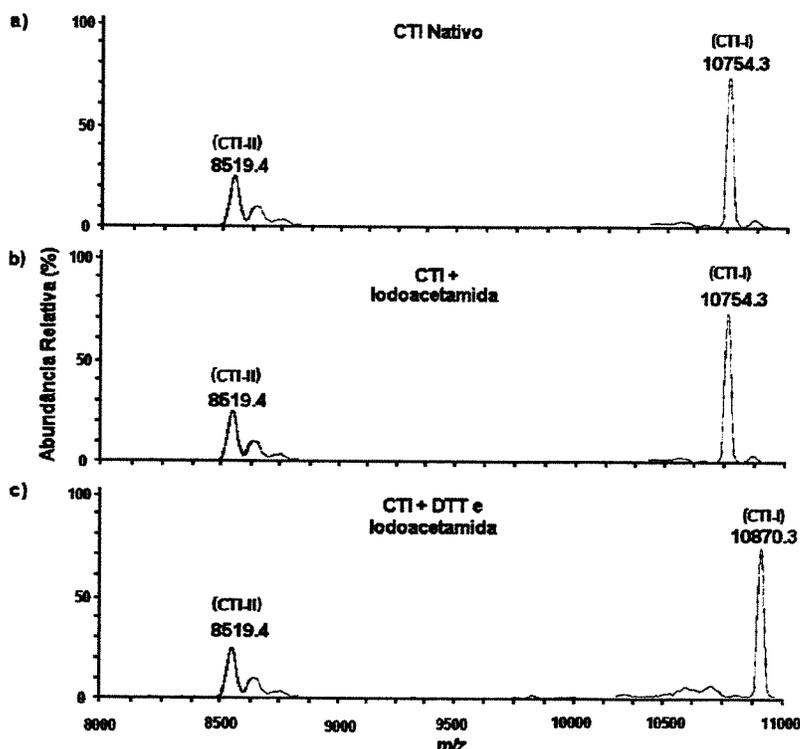


Figura 05 - Espectro de massa (MALDI-TOF) do inibidor CTI: a) CTI não reduzido, b) CTI após o tratamento com iodoacetamida e c) CTI tratado com DTT e iodoacetamida.

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS SUBUNIDADES DE CTI

A composição global dos aminoácidos das subunidades de CTI é mostrada na **Tabela 02**. Para comparação, valores calculados da composição de aminoácidos a partir da seqüência de STI e BBI são citados. A composição de aminoácidos de CTI-I e CTI-II foi bastante similar, com considerável conteúdo de Asx e Glx. CTI mostrou-se rico nos aminoácidos glicina, serina e prolina, apresentando baixos níveis de metionina e aminoácidos aromáticos. Para o cálculo da composição de aminoácidos das subunidades, foram utilizados os valores de massa molecular determinado por espectrometria de massas 10.719 e 8.244 kDa para CTI-I e CTI-II, respectivamente. Ácido aspártico e ácido glutâmico não foram distinguidos de asparagina e glutamina, respectivamente.

Tabela 02 - Composição de aminoácidos (mol/mol) das subunidades de CTI em comparação com STI e BBI de sementes de soja.

Aminoácido	Subunidades				
	CTI-I	CTI-II	CTI	SBTI	BBI
Asx	5	6	11	26	21
Glx	9	8	17	18	7
Ser	14	9	23	11	9
Gly	16	11	27	16	0
His	3	1	4	2	1
Arg	5	4	9	9	2
Thr	3	2	5	7	2
Ala	5	2	7	8	4
Pro	10	6	16	10	6
Tyr	3	2	5	9	2
Val	7	5	12	14	1
Met	1	0	1	2	1
Cys	2	0	2	4	14
Ile	3	4	7	14	2
Leu	6	2	8	15	2
Phe	1	0	1	9	2
Lys	9	8	18	10	5
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	2	0
Total	102	71	173	186	71

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

O resultado da eletroforese bidimensional do inibidor CTI está evidenciado na **Figura 06**, confirmando um padrão bastante heterogêneo observado na espectrometria de massas. Observa-se pelo menos seis *spots* concentrados na faixa de 11 a 9 kDa, sendo três com características ácidas e três com características básicas.

Na **Figura 07** observa-se o gel de duas dimensões para as subunidades CTI-I e CTI-II purificadas em coluna de fase reversa C18. Nessas condições, CTI-I apresentou três *spots* a, b e c com pontos isoelétricos de 8.0, 8.5 e 9.0 e CTI-II migrou no gel também como três *spots* d, e e f com o pI de 4.3, 4.6 e 4.7, sugerindo pelo menos três isoformas para ambas subunidades.

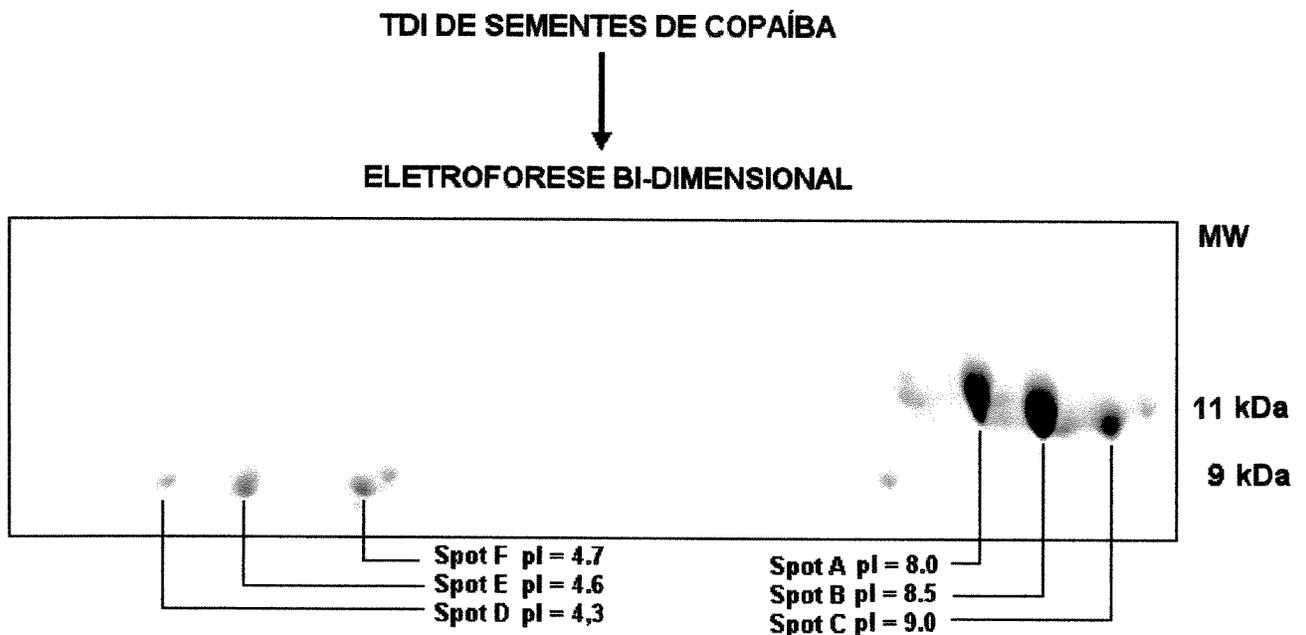


Figura 06 - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (12,5 %) de CTI (10 µg). A primeira dimensão foi feita em gradiente não linear de pH 3-10 e a segunda dimensão em SDS-PAGE com concentração de bis-acrilamida 12,5%. O gel foi corado por impregnação por prata. Da esquerda para a direita há um aumento do pI e de baixo para cima a massa molecular aumenta.

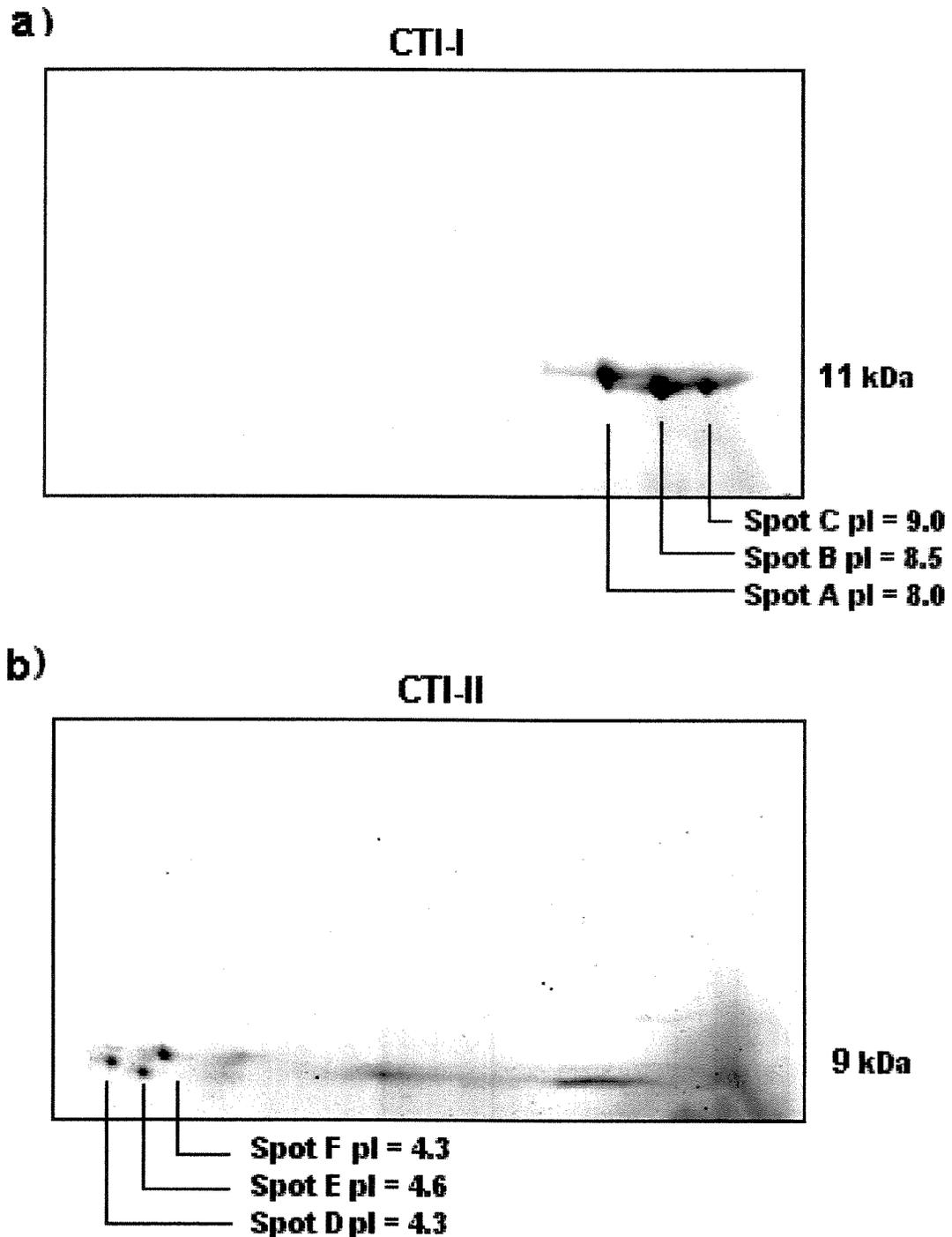


Figura 07 - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (12,5 %) das subunidades purificadas. A primeira dimensão foi feita em gradiente não linear de pH 3-10 e a segunda dimensão em SDS-PAGE com concentração de acrilamida 12,5 %. Da esquerda para a direita há um aumento do pI e de baixo para cima a massa molecular aumenta. **a)** CTI-I (10 μ g) **b)** CTI-II (10 μ g).

ESPECTRO DE MASSA DOS DIGESTOS TRÍPTICO DAS ISOFORMAS DE CTI

A análise dos espectros da **Figura 08** confirma a presença dos peptídeos 01 RLVDTVKGPLENGGAAEYYILPI 25 e 01 WQLPSVKIGGEPK 12, que representam as regiões N-terminal previamente determinadas para as subunidades CTI-I e CTI-II nos *spots* a e f. Os espectros de massa dos peptídeos gerados pela digestão das isoformas observadas em gel 2D das subunidades de CTI com tripsina, podem ser observados nas **Figuras 09** e **10**. Não foi verificado um padrão de clivagem para as isoformas individualizadas de cada subunidade. Os peptídeos na faixa de 860.0 a 870.0 são comuns nas três isoformas (*spot* a, b, e c) da subunidade CTI-I como pode ser observado na **Figura 09**.

As isoformas de CTI-II também mostraram-se bastante divergentes em relação aos espectros gerados pela digestão triptica, sendo os perfis das isoformas d e e similares. Observa-se a predominância dos peptídeos de massa 843.37, 940.19 e 962.19 nas três isoformas de CTI-II (*spots* d, e e f). Entretanto, os demais peptídeos apresentam massas diferentes reforçando uma certa heterogeneidade na seqüência primária destas proteínas (**Figura 10**).

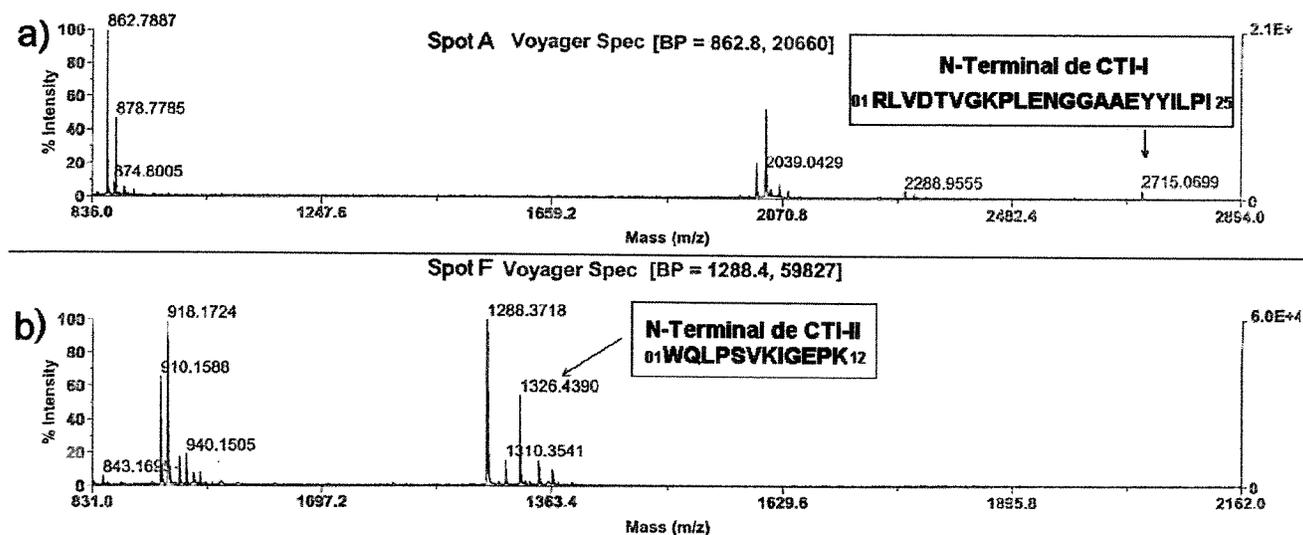


Figura 08 - Espectro de massa de peptídeos gerado pela digestão triptica dos *spots* a e f e identificação dos peptídeos N-terminal das subunidades CTI-I e CTI-II.

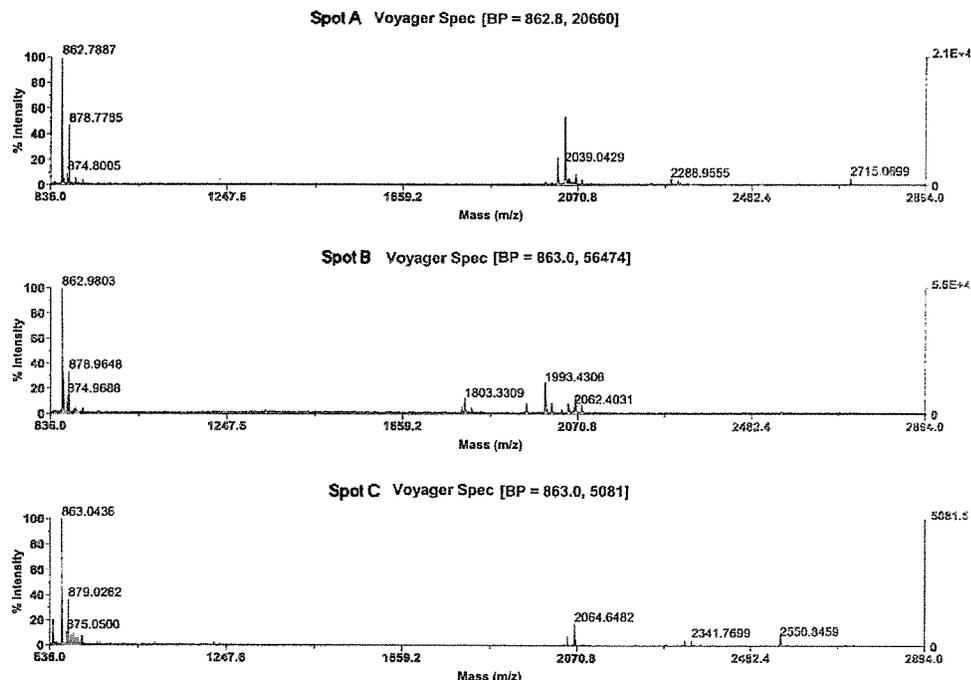


Figura 09 - Espectro de massa de peptídeos gerado pela digestão tríptica das isoformas (spot a, b e c) da subunidade CTI-I do inibidor CTI de sementes de copaíba.

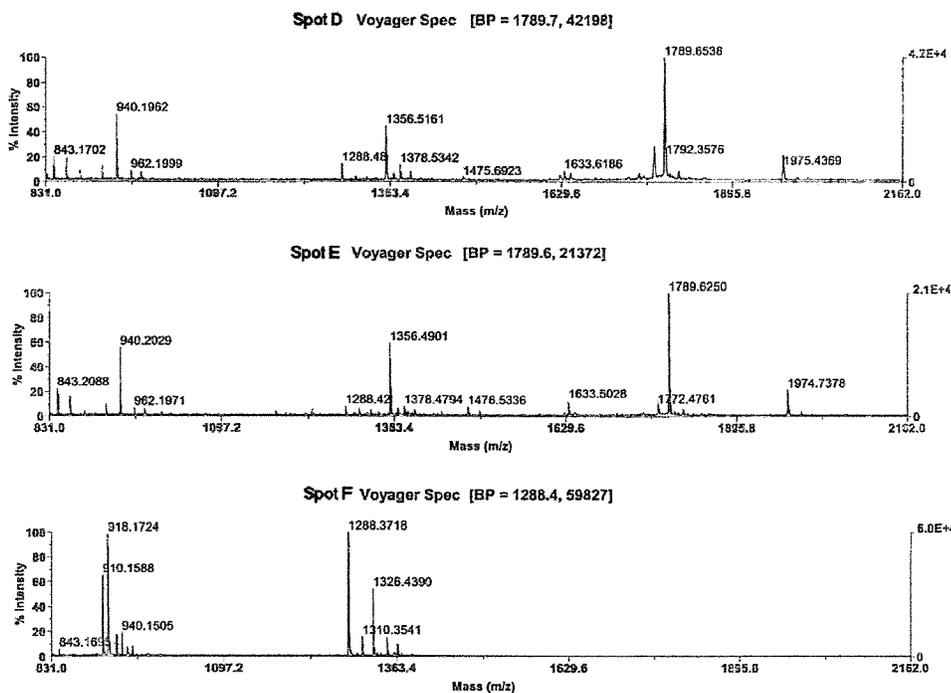


Figura 10 - Espectro de massa de peptídeos gerado pela digestão tríptica das isoformas (spot d, e e f) da subunidade CTI-II do inibidor CTI de sementes de copaíba.

DISCUSSÃO

A família de inibidores do tipo Kunitz é marcada por um número significativo de proteínas com regiões da estrutura primária altamente conservadas porém, com massa molecular, número e posição das pontes dissulfeto distintas entre outras características funcionais divergentes. Há quem assuma que estas diferenças estruturais estejam relacionadas filogeneticamente com a evolução dos vegetais. A presença de isoformas, explicada por modificações pós traducionais, assim como iso-inibidores, devido à duplicação de família de genes, tem sido amplamente registrada para os inibidores do tipo Kunitz (Di Ciero et al., 1998; Macedo et al., 2002a; Valueva et al., 1997).

Os inibidores de sementes de leguminosas são encontrados sob várias isoformas, como evidenciado por Kalume et al. 1995 e Di Ciero et al. 1998. Algumas técnicas, como a espectrometria de massas, determinação da seqüência N-terminal e eletroforese bidimensional vêm sendo amplamente exploradas com o propósito de caracterizar melhor estas isoformas presentes em sementes. Esta parte da tese discute um pouco sobre as características estruturais das isoformas do inibidor CTI, um atípico representante da família Kunitz em sementes, utilizando as técnicas de espectrometria de massas (MALDI-TOF e ESI-QTOF), gel de eletroforese bidimensional, composição global dos aminoácidos das subunidades de CTI e espectro de massas dos peptídeos gerados pela digestão trípica das isoformas das subunidades de CTI.

Uma ampla faixa de massa molecular (5000 – 23000 Da) tem sido relatada para os inibidores de tripsina (Tis) dependendo do método usado para estimar (ultracentrifugação, cromatografia de exclusão molecular gel de eletroforese em SDS-PAGE e composição de aminoácido). Programas de alinhamento das seqüências dos genes e de aminoácidos dos inibidores de proteases sugerem que estes exibem forte tendência para formar homo ou heterodímeros em soluções, fato que tem dificultado a determinação da massa molecular e a caracterização do número de isoformas, iso-inibidores ou inibidores diferentes em sementes (Prakash et al., 1996).

Os inibidores de Kunitz foram, inicialmente, encontrados como cadeia polipeptídica única, com massa molecular de aproximadamente 20 kDa e possuidores de duas pontes dissulfeto em posições definidas. Há muito tempo, acredita-se que aqueles inibidores de massa molecular relativamente alta, apresentam-se na forma polimérica, associados em

dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 20 kDa.

Os inibidores de Kunitz purificados e caracterizados da subfamília Mimosoideae da família das leguminosas e aqueles purificados de batata da família Solanaceae são normalmente detectados como heterodímeros e apresentam duas pontes dissulfeto, estabilizando a sua estrutura composta por duas cadeias: uma cadeia maior de aproximadamente 16 kDa e uma menor de 5 kDa (Batista et al., 1996). Segundo Richardson (1991), essas duas cadeias resultam de um processamento proteolítico de um precursor de cadeia única, mas as causas que determinam esta clivagem unicamente em espécies da subfamília Mimosoideae e família Solanaceae são ainda desconhecidas.

CTI de copaíba tem sido resolvido em dois picos distintos (CTI-I e CTI-II) em cromatografia de fase reversa em coluna C18, onde ambos os picos aparentemente apresentavam atividade anti-tríptica. Gel de eletroforese SDS-Tricina de CTI também tem demonstrado pelo menos duas bandas em condições reduzidas com DTT. O estudo da homologia seqüencial de ambas as subunidades para a região N-terminal demonstrou que, CTI-I apresentava homologia a certos inibidores do tipo Kunitz, enquanto o CTI-II não foi homólogo à região N-terminal de nenhum inibidor já descrito, sugerindo inicialmente a presença de dois inibidores de baixa massa molecular (Silva et al., 2001). Porém, quando se comparou CTI-II com regiões internas da seqüência primária dos inibidores de Kunitz observou-se um discreto grau de similaridade, indicando que tenha ocorrido uma clivagem proteolítica pós traducional.

CTI-I e CTI-II poderiam ser fragmentos proteolíticos de uma mesma proteína proveniente de uma coluna de fase reversa ou até mesmo devido a outras etapas de purificação? Isto tem sido observado na literatura principalmente para inibidores purificados por cromatografia de afinidade. A purificação dos inibidores estudados por Batista (1997) foi realizada basicamente por cromatografia de afinidade em tripsina-sepharose. Este procedimento pode representar risco de proteólise do inibidor caso a tripsina não esteja imobilizada na sua forma inativa, podendo destruir a atividade do inibidor e ocasionar heterogeneidade nas preparações obtidas (Weder & Link, 1993).

Assim, teve-se o cuidado de utilizar a resina de anidro tripsina sepharose, metodologia desenvolvida por Xavier-Filho & Campos em 1983, para a purificação de CTI de sementes de copaíba, onde a enzima imobilizada possui um resíduo de desidro-alanina no

seu sítio ativo, que permite a purificação do inibidor e evitando a sua proteólise. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o fato do gel de eletroforese em condições desnaturantes ter demonstrado duas bandas de proteínas (11 e 9 kDa) para todos os passos de purificação inclusive para o extrato bruto (dado não mostrado), exceto para aquele da coluna de fase reversa C18, onde se observou a purificação das duas bandas como demonstrado na **Figura 01**.

Essas evidências sugerem que o inibidor CTI sofreu uma clivagem proteolítica, contudo, esta não teria ocorrido durante os processos de purificação e sim por processamento proteolítico pós traducional de uma proteína precursora de cadeia única, assim como observado em espécies da subfamília *Mimosoideae*.

Gel de eletroforese SDS-Tricina e gel filtração em coluna de exclusão foram utilizados na determinação da massa molecular das subunidades do inibidor CTI. A massa molecular relativa de aproximadamente 20 kDa para CTI em condições não desnaturantes é devido às associações das diferentes subunidades monoméricas por interações fracas. Isto tem sido relatado tanto para inibidores de Bowman-Birk, quanto para inibidores de Kuntiz (Birk & Applebaum, 1985; Wu & Whitaker, 1990). Contudo, não se considerava a agregação de subunidades distintas como para o inibidor CTI. Uma melhor caracterização da massa molecular acurada e do número de isoformas para as subunidades de CTI foi, então, avaliada pela técnica de espectrometria de massas.

Os espectros de massas (MALDI-TOF) para as subunidades CTI-I e CTI-II do inibidor CTI representados nas **Figuras 03 e 04** confirmaram uma vasta microheterogeneidade para CTI, com predominância dos picos de massa 10.719 e 8.244 para as subunidades de CTI, respectivamente. Parte destas proteólises tem sido sugerida como resultado da exposição dos inibidores à proteases envolvidas no processamento pós-traducional de precursores de proteínas de reservas em sementes. Nas **Figuras 03 e 04 (b)** observa-se pelo menos sete isoformas para cada subunidade de CTI, característica marcante dos inibidores de Kunitz (Macedo et al., 2002a; Pando et al., 2001).

A composição global de aminoácidos das subunidades de CTI mostrou que este inibidor apresenta um alto conteúdo dos resíduos de serina, glicina e lisina (**Tabela 02**). Metionina e fenilalanina foram pouco evidenciados na composição global da molécula de CTI e um baixo número destes aminoácidos tem sido observado em outros inibidores de leguminosas (Pando et al., 1999). Já asparagina e glutamina, bem como triptofano não foram

detectados, pois são suscetíveis à hidrólise ácida. Além disso, CTI-I apresentou duas cisteínas, o que não foi observado para CTI-II, resultados confirmados por espectrometria de massas (MALDI-TOF), de CTI nativo, CTI reduzido e carboxiamidometilado com iodoacetamida (**Figura 05**). Esses resultados vão de encontro aos obtidos para alguns inibidores de tripsina do tipo Kunitz encontrados na subfamília Caesalpinoideae, que apresentam apenas uma ponte dissulfeto (Cavalcanti et al., 2002).

Tanto os inibidores de Kunitz quanto os inibidores de Bowman-Birk tem sido extensivamente estudados em uma ampla variedade de sementes, principalmente em leguminosas. Nestes, incluem isoformas e iso-inibidores que são atribuídos às variações genéticas (família multi-gênicas), bem como modificações pós traducionais ou ainda mutações no código genético. A aparente perda de um número significativo de resíduos de aminoácidos durante modificações pós-traducionais dos inibidores de proteinases tem sido relatado para inibidores de várias espécies de leguminosas (Tan-Wilson et al., 1987). A origem e o papel fisiológico das isoformas em plantas ainda não estão bem esclarecidos. Wilson & Chen (1983) mostraram que isoformas resultam do processamento proteolítico pós traducional da região N e C-Terminal. Para explicar a grande variedade de isoformas, outras hipóteses, como a presença de genes múltiplos precisam ser consideradas.

A eletroforese bidimensional de CTI (**Figura 06**) revelou a presença de vários *spots* na faixa de 10 e 8 kDa. Quando CTI foi submetido à purificação em cromatografia de fase reversa em coluna C18, observou-se 3 *spots* para CTI-I com pI de 8.0, 8.5 e 9.0 e três *spots* para CTI-II com pI de 4.7, 4.6 e 4.3 como mostrado na **Figura 07**. Esta diferença de ponto isoelétrico pode ser devido a um ou mais aminoácidos na seqüência das subunidades CTI-I e CTI-II proveniente de processamento proteolítico pós traducional na região N ou C terminal, como proposto por Wilson & Chen, (1983) e Kalume et al. (1995), ou também devido a estas isoformas derivarem de uma família multigênica.

Para determinar se os *spots* da **Figura 07** faziam parte de uma mesma família gênica, utilizou-se a espectrometria de massas (**Figuras 09 e 10**). O espectro de massa dos peptídeos gerado pela digestão tríptica das subunidades de CTI, sugere que estas apresentam seqüências de aminoácidos bastante heterogêneas, onde os *spots* d e e da subunidade CTI-II parecem ser mais próximos. A diferença nos espectros de massas dos peptídeos por digestão tríptica somado aos valores próximos de ponto isoelétrico observados em gel de eletroforese bidimensional, sugere que as isoformas de CTI podem ter derivado de

pelo menos duas famílias gênicas distintas e também passado por modificações pós-traducionais.

Em plantas superiores, muitas proteínas e enzimas são codificadas por famílias multigênicas e, em *Arabidopsis*, estima-se que 20 % dos genes pertencem a membros da mesma família (Bevan et al., 1998). A existência de famílias multigênicas pode, muitas vezes, refletir níveis adicionais de controle genético ou a existência de isoformas de proteínas com função específica (Mekhedov et al., 2000). Não foram identificados em todos os *spots* os peptídeos N-terminal (**Figura 08**) determinados por degradação de Edman, para as subunidades CTI-I e CTI-II, indicando que estes apresentam regiões N-terminal diferentes devido a prováveis processamentos proteolíticos pós traducionais, ou até mesmo mutações com substituição de um ou mais aminoácidos.

O inibidor CTI de sementes de *Copaifera langsdorffii* foi isolado e fracionado em várias isoformas por gel de eletroforese bidimensional. A microheterogeneidade de CTI foi também confirmada por espectrometria de massas (MALDI-TOF e ESI-QTOF). A origem destas isoformas para o inibidor CTI parece resultar a partir de vários processos independentes. Assim, a diversidade de isoformas para CTI pode ser explicada por mutações específicas que resultaram na substituição de resíduos de aminoácidos na seqüência interna da proteína, ou ainda, ser produtos de famílias gênicas distintas que sofreram modificações pós-traducionais por processos proteolíticos nas regiões C e N terminal, esclarecendo diferenças de massas e de ponto isoelétrico para os *spots* de cada subunidade. O papel destas isoformas para CTI no metabolismo da planta é incerto, mas estas podem ser requeridas para uma variedade de eventos envolvendo a interação específica inibidor com enzimas endógenas ou exógenas.

02. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DO INIBIDOR CTI DE TRIPSINA

SEQUENCIAMENTO DA SUBUNIDADE CTI-I (SPOT A) DO INIBIDOR CTI

A digestão tríptica da subunidade CTI-I (*spot A*) do inibidor de copaíba proporcionou a determinação da seqüência de vários peptídeos. Entre estes, a dos peptídeos de *m/z*: 1361.665 (correspondente aos resíduos 25-39), 1221.550 (90-100) e 862.387 (94-100), permitindo um *overlapping* bastante significativo da ordem dos resíduos de aminoácidos nesta subunidade. A **Figura 01 A** evidencia o espectro de massa obtido do ESI-QTOF, permitindo o sequenciamento do peptídeo correspondente aos resíduos 40-58 (CPLSVVQSPSDHSNTLPVR). O espectro MS/MS deste íon o revelou como triplamente carregado com *m/z* correspondente a 678.67. Um peptídeo de massa 5526.93, compreendendo ao *loop* reativo, entre os resíduos 40-91, foi detectado nas análises por MALDI-TOF no modo linear quando a molécula de CTI-I nativa foi digerida por tripsina.

A segunda digestão, com a protease SV8 Glu-C, solucionou algumas falhas permitindo o preenchimento de algumas posições não seqüenciadas nos digestos trípticos. A análise do espectro MS/MS confirmou a seqüência dos resíduos correspondentes às posições 1-16, 15-24 e 39-50 na seqüência da subunidade CTI-I. A **Tabela 01** mostra os fragmentos peptídicos seqüenciados, obtidos por espectrometria de massas combinando MALDI-TOF e ESI-QTOF.

Tabela 01 - Cobertura da seqüência completa da subunidade de CTI-I (*spot A*) a partir de peptídeos selecionados da digestão com as proteases tripsina e Glu-C SV8, observados por MALDI-TOF e seqüenciados por EIS-QTOF.

Posição do resíduo	Espectrometro de massa	Massa Calculada [M+H] ⁺ <i>m/z</i>	Digestão Enzimática	Seqüência do Peptídeo
1-24	MALDI-TOF	2733.420	Tripsina	RLVDTNGKPIENDGAEYYILPVTR
2-24	MALDI-TOF	2577.319	Tripsina	LVDTNGKPIENDGAEYYILPVTR
7-24	ESI-QTOF	2034.04	Clostripaina	GKPIENDGAEYYILPVTR
25-39	ESI-QTOF	1361.665	Tripsina	DSGGGLVLASSGGER
40-58	ESI-QTOF	2036.022	Tripsina	CPLSVVQSPSDHSNTLPVR
40-91	MALDI-TOF	5529.52	Loop reativo	CPLSVVQSPSDHSNTLPVRFKSSGQKYSVGLDLPLMLLAVGFVATVSLPRC
66-89	MALDI-TOF	2645.24	Tripsina	YISVGLDLPLMLLAVGFVATVSLPR
90-100	ESI-QTOF	1221.550	Tripsina	CAGKPSMADWR
94-100	ESI-QTOF	862.387	Tripsina	PSMADWR
1-16	ESI-QTOF	1727.855	SV8	RLVDTNGKPIENDGAE
15-24	ESI-QTOF	1224.6623	SV8	AE YLLPVTR
17-24	ESI-QTOF	1024.23	SV8	YLLPVTR
17-38	ESI-QTOF	2211.129	SV8	YLLPVTRDSGGGLVLASSGGE
39-50	ESI-QTOF	1287.636	SV8	RCPLSVVQSPSD
51-72	MALDI-TOF	1670.886	SV8	HSNTLPVRYISVGLD
73-99	ESI-QTOF	2644.402	SV8	LPLMLLAVGFVATVSPRCAGKPSMAD

Um íon duplamente carregado de massa 1993.0 foi analisado. Este apresentou seqüência (*GKPLENDGAGYYLVTGP*) correspondente à seqüência de 7-20, como pode ser visualizado na **Figura 1B**.

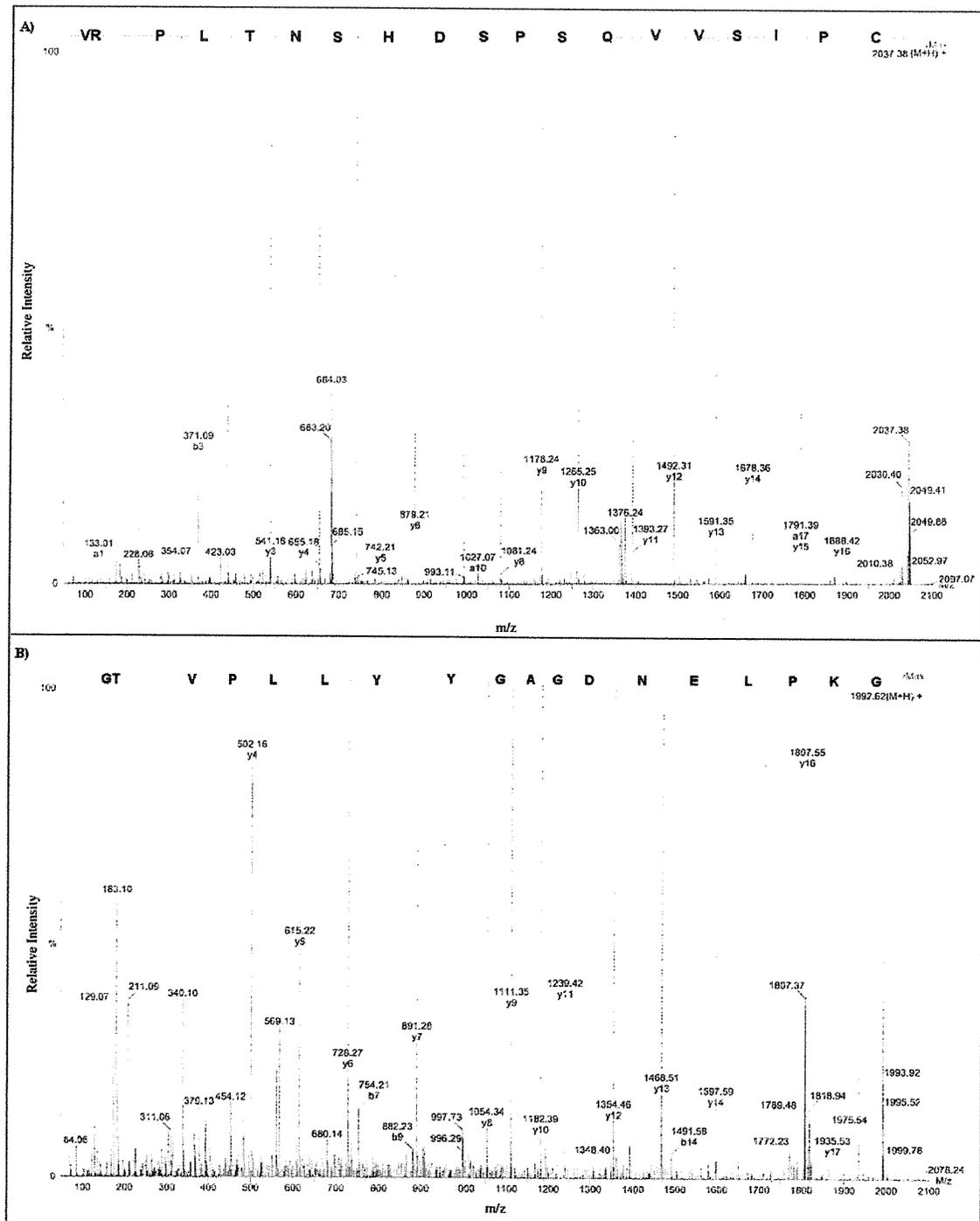


Figura 01 - A) Espectro MS/MS do íon peptídeo triplamente carregado de massa 2036,02 (*CPLSVVQSPSDHSNTLPVR*). **B)** Espectro MS/MS do íon duplamente carregado de massa 1993,86 (*GKPLENDGAGYYILPVTG*).

O íon duplamente carregado de m/z 1727.85 foi o pico predominante no digesto com a protease SV8 e correspondia ao peptídeo da região N-terminal de 1-16 (RLVDTNGKPIENDGAE) já seqüenciado por degradação de Edman por Silva et al. 2001. A presença de um fragmento peptídico de m/z 2577.319 (correspondente à seqüência 2-24) proveniente do digesto tríptico e observado por MALDI-TOF forneceu uma informação complementar da seqüência, suportando um resíduo de arginina na posição 1. A digestão adicional com a protease clostripaína foi realizada para solucionar alguns pontos obscuros na seqüência da subunidade CTI-I do inibidor CTI.

SEQUENCIAMENTO DA SUBUNIDADE CTI-II (SPOT F) DO INIBIDOR CTI

A análise dos espectros de MS/MS dos digestos de CTI-II em HPLC capilar acoplado ao espectrômetro de massas (ESI-QTOF) resultou em íons de peptídeos que cobriram significativamente quase toda a seqüência de resíduos de aminoácidos da subunidade CTI-II (spot F) do inibidor CTI como evidenciado na Tabela 02. A digestão proteolítica com SV8 revelou dois íons de massa 1287.0 e 1488.0 com padrões de clivagens muito semelhantes (Figura 02).

Tabela 02 - Cobertura da seqüência completa da subunidade de CTI-II (spot F) a partir de peptídeos selecionados da digestão com as proteases tripsina e Glu-C SV8, observados por MALDI-TOF e seqüenciados por EIS-QTOF.

Posição do resíduo	Espectrometro de massa	Massa Calculada [M+H] ⁺ m/z	Digestão Enzimática	Seqüência do Peptídeo
1-12	ESI-QTOF	1325.721	Tripsina	WQLPSVTVGPNK
13-21	ESI-QTOF	909.482	Tripsina	VSAFGGPFK
1-21	ESI-QTOF	2235.203	Tripsina	WQLPSVTVGPNK VSAFGGPFK
22-30	MALDI-TOF	1039.457	Tripsina	IEEGEDGYK
31-55	MALDI-TOF	2756.274	Tripsina	LVYSSQEEGSLNLEIESDSGS DER
55-66	ESI-QTOF	1343.804	Tripsina e Clostripaína	LVVTDGRPFIVK
67-72	MALDI-TOF	925.477	Tripsina	FEDFIVR
1-24	MALDI-TOF	2587.355	SV8	WQLPSVTVGPNK VSAFGGPF KIEE
28-37	ESI-QTOF	1287.382	SV8	NGYQLVYSSQE
26-37	ESI-QTOF	1488.53	SV8	AEDGYQLVYSSQE
38-44	Homologia	745.409		GSLNLE
54-59	Homologia	702.414		RLVVT D
60-67	ESI-QTOF	945.551	SV8	GRPFIVKE
69-73	Homologia	663.382		FIVRE

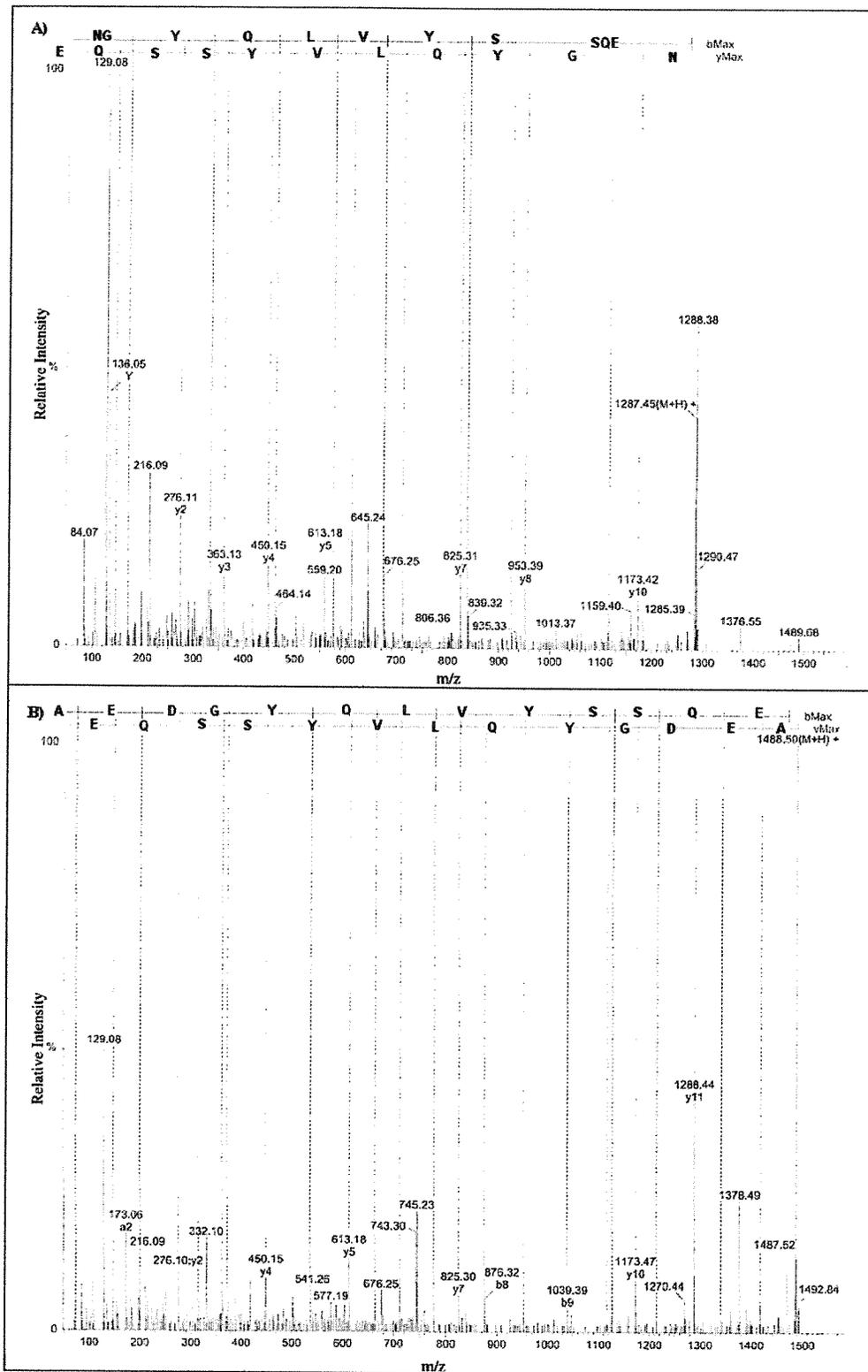


Figura 02 - A) Espectro MS/MS do íon peptídico duplamente carregado de massa 1287.542 (NGYQLVYSSQE). B) Espectro MS/MS do íon duplamente carregado de massa 1488.00 (AEDGYQLVYSSQE).

Ambos os íons correspondiam a fragmentos do peptídeo 26-37 (AEDGYQLVYSSQE). A diferença de massa de 201 Da entre os dois íons pode ser devido a falta da seqüência dos resíduos (AE) e substituição do resíduo D28 por um resíduo N na porção N-terminal do peptídeo 26-37 (AEDGYQLVYSSQE), correspondendo a seqüência de resíduos 28-37 (NGYQLVYSSQE) de massa 1287.0. Substituições de aminoácidos com características estruturais químicas e propriedades semelhantes, como no exemplo acima, tem sido explicada pela substituição de um único nucleotídeo na seqüência de ácido nucléico.

MAPEAMENTO DOS PEPTÍDEOS E ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO INIBIDOR CTI

Os peptídeos internos de CTI-1, que gerados por digestão proteolítica, permitiram montar um mapa dos peptídeos da seqüência primária a partir da interpretação dos espectros obtidos por espectrômetros de massa MALDI-TOF e ESI-QTOF, como pode ser observado na **Figura 03**. Um total de 52 diferentes peptídeos obtidos pela digestão *in gel* dos spots A e F para CTI-I e CTI-II, respectivamente foram detectados por MALDI-TOF ou seqüenciados por nano cromatografia em HPLC acoplado a um espectrômetro de massas ESI-QTOF, correspondendo a 164 resíduos de aminoácidos ou aproximadamente 90% da seqüência do inibidor CTI.

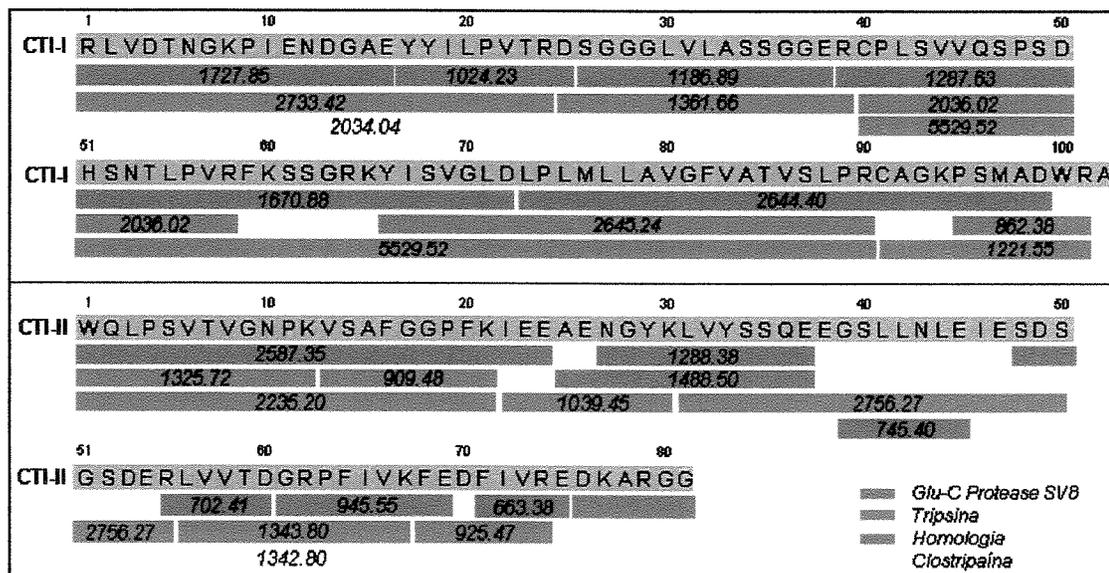


Figura 03 - Seqüência primária do inibidor CTI-1. Os peptídeos obtidos após a fragmentação enzimática por tripsina, Glu-C Protease SV8 e clstripaína.

Nenhuma cobertura por MALDI-TOF ou ESI-QTOF foi obtida para os peptídeos de baixa massa molecular descritos adiante: 745.40 (GSLLNLE), 702.41 (RLVVTD) e 663.38 (FIVRE). A seqüência destes peptídeos foi obtida por comparação com SBTI e outros inibidores de tripsina do tipo Kunitz já seqüenciados. Estes peptídeos de baixa massa molecular foram confirmados a partir da seqüência primária proposta por densidade eletrônica. Não obstante, uma cobertura de aproximadamente 90 % da seqüência da proteína forneceu evidências positivas de que o inibidor CTI-1 pertence à família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz de sementes de leguminosas.

DISCUSSÃO

A aplicação da espectrometria de massas para biomoléculas tem se revelado nos últimos anos, uma técnica rotineira de grande importância para a análise de proteínas. Existem várias técnicas de espectrometria que poderiam ser de grande valia, contudo, as técnicas *Electrospray Ionization* (ESI) e *Matrix assisted laser desorption-ionization* (MALDI) têm sido revolucionárias na última década. A combinação do ESI e MALDI na espectrometria de massas em conjunto com o avanço de *softwares* específicos e padronização de novas técnicas tem permitido a ampliação do uso da espectrometria de massas na determinação da massa molecular acurada, no sequenciamento de proteínas, no estudo de modificações pós traducionais, na detecção de modificações químicas, entre outras aplicações (Alomirah et al., 2000).

As técnicas de espectrometria de massas *Eletrospray ionization* (ESI) e *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF) em combinação com digestão *in gel* foram usadas para determinar a seqüência das subunidades de CTI de 10,6 e 8,9 kDa na ausência de uma seqüência genômica. Os *spots* A e F do gel 2D para cada subunidade foram seqüenciados e mostraram-se muito similares a outros inibidores do tipo Kunitz de sementes de leguminosas. O *spot* A foi confirmado ser um fragmento correspondente à região N-terminal do inibidor do tipo Kunitz, consistindo dos resíduos de 1-102 e apresentando uma ponte dissulfeto. O *spot* F foi apresentou 81 resíduos de aminoácidos, sendo portanto, a região C-terminal de um inibidor do tipo Kunitz não apresentando a segunda ponte dissulfeto.

A **Figura 04** evidencia a seqüência completa de CTI-1 em comparação com outras seqüências primárias de inibidores do tipo Kunitz (*SwTI*, *BvTI*, *DrTI*, *SbTI*, *WTI*, *PtTI*, *EcTI*, *EITI* e *AcTI*). Uma pesquisa no banco de dados BLAST da página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> indicou 32 % de homologia para *PtTI* e *AcTI* e 33 % de identidade para o inibidor *BvTI*. A massa calculada de CTI foi determinada pela soma das massas moleculares de CTI-I e CTI-II (18501.4 Da) obtidas por espectrometria de massas.

A massa de CTI relativamente inferior à massa molecular calculada para os inibidores do tipo Kunitz, de sementes de outras espécies de leguminosas, como por exemplo o SBTI de soja que apresenta massa molecular de 20000.2, sugere definitivamente que CTI é um novo inibidor, atípico constituído por duas subunidades. O número de resíduos de aminoácidos por cadeia polipeptídica de CTI (aproximadamente 183) explica as diferenças de massas para outros inibidores do tipo Kunitz, visto que o *DrTI* de *Delonix regia* tem 188 (Pando et al., 2001) e o *SwTI* de *Swartzia pickellii* tem 178 resíduos de aminoácidos (Cavalcanti et al., 2002).

A metodologia usada na determinação da estrutura primária do inibidor CTI, designada por micro-sequenciamento permitiu a determinação da seqüência de resíduos de aminoácidos com alta sensibilidade, de possíveis variações em posições específicas, bem como permitiu identificar algumas modificações pós-traducionais. Os métodos convencionais utilizados na determinação da estrutura primária: sequenciamento N-terminal por degradação de Edman e o sequenciamento C-Terminal requer muito mais tempo e material do que o micro-sequenciamento por espectrometria de massas, além de requerer uma amostra com grau de pureza acima de 90 %.

A análise dos espectros de massas fornece uma abundância de informações sobre as proteínas em um curto período de tempo, requerendo somente baixas concentrações de amostra (de pico a fentomoles) e tolerando a presença de componentes secundários (Smith & Zhou 1990; Gehrig & Biemann 1996; Wu & Watson 1997; Mhatre et al., 1999; Barbiz et al., 2000). A obtenção da seqüência em poucas semanas vem corroborar a versatilidade e poder da técnica de micro-sequenciamento por espectrometria de massas na determinação da estrutura primária de proteínas de sementes, mesmo na ausência de uma seqüência genômica.

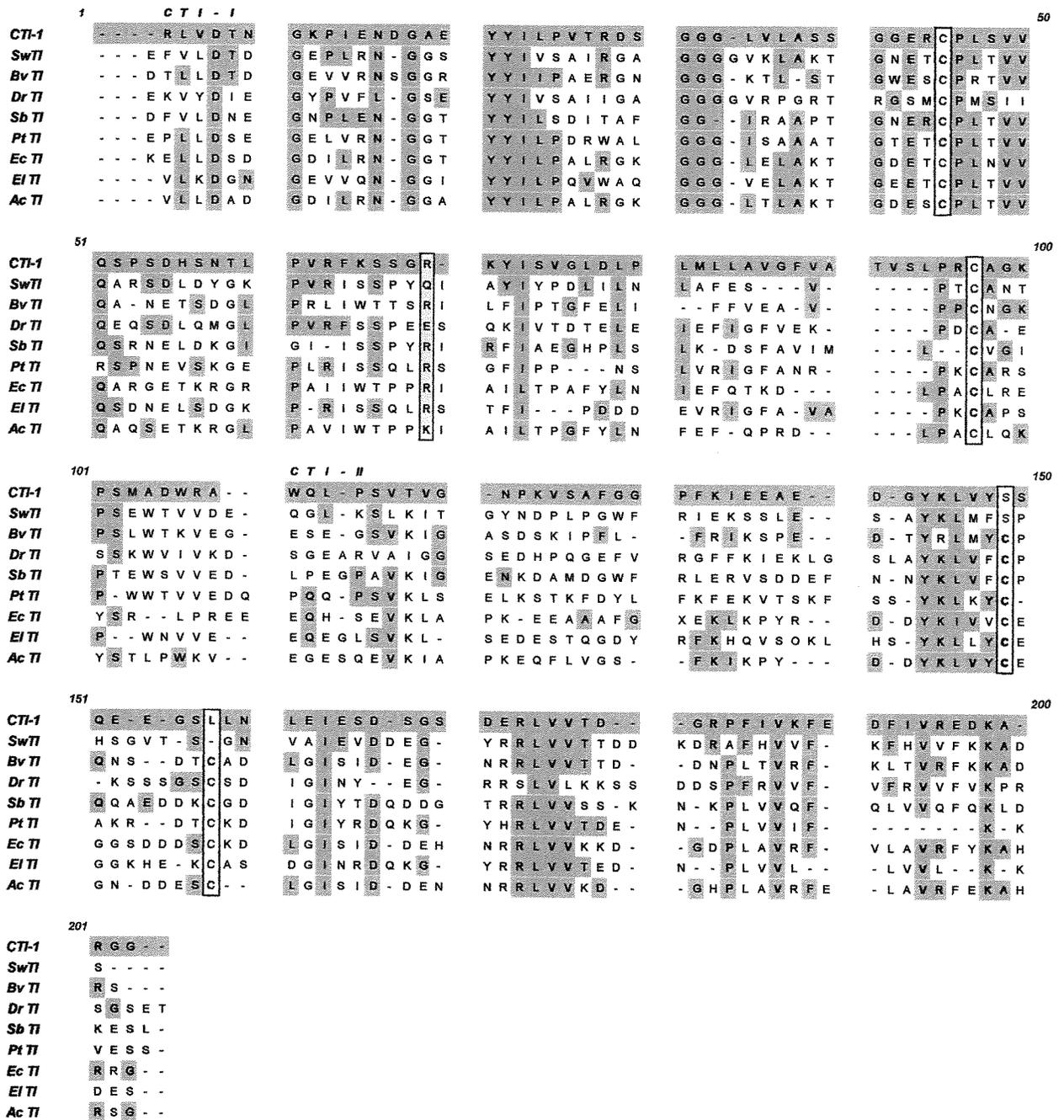


Figura 04 - Comparação da homologia seqüencial de CTI-1 com outros inibidores do tipo Kunitz. 1, CTI-1 (Inibidor de tripsina de *Copaifera langsdorffii*); 2, SwTI (Inibidor de *Swartzia pickellii* – Cavalcanti et al., 2002); 3, BvTI (Inibidor de *Bauhinia variegata*, var.candida, Di Ciero et al., 1998); 4, DrTI (Inibidor de *Delonix regia*, Pando et al., 2001); 5, SBTI (Inibidor de tripsina de soja, Koide & Ikenaka 1973); 6, PtTI (Inibidor de *Psophocarpus tetragonolobus*, Yamamoto et al., 1983); 7, EcTI (Inibidor de *Enterolobium contortisiliquum*, Batista et al., 1996); 8, EITI (Inibidor de *Erythrina latissima*, Joubert et al., 1985) e AcTI (Inibidor de *Acacia confusa*, Wu & Lin 1993). A região do sítio reativo está evidenciada em azul e os resíduos de cisteína em amarelo. O alinhamento múltiplo das seqüências foi construído segundo o (Copert et al., 1998).

Os peptídeos obtidos pela digestão enzimática dos *spots* A e F e seqüenciados por cromatografia capilar (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massas ESI Q-TOF, foram suficientes na determinação da estrutura primária e para fazer o estudo de sobreposição de CTI (**Figura 03**). Baseado na similaridade da seqüência primária dos resíduos de aminoácidos, CTI foi classificado como inibidor de tripsina do tipo Kunitz, contudo apresenta somente uma ponte dissulfeto (posição 40-91), em contraste com os demais inibidores desta família que apresentam duas pontes dissulfeto (Kim et al., 1985; Monte-Negreiros et al., 1991). Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados durante a caracterização das isoformas do inibidor CTI. A presença de uma única ponte dissulfeto provavelmente deve estar relacionada à manutenção da estabilidade conformacional do *loop* reativo para a atividade de inibição da tripsina na subunidade maior CTI-I, como pode ser concluído com os dados da estrutura tridimensional apresentado a seguir e já publicados (Krauchenco et al., 2001 e Krauchenco et al., 2004).

O sítio reativo foi determinado por homologia seqüencial a outros inibidores do tipo Kunitz. CTI apresentou no sítio reativo, designado por P1 (posição 64), o resíduo de arginina assim como, a maioria dos inibidores de tripsina do tipo Kunitz. Alguns resíduos básicos (Lys ou Arg adicionais) na vizinhança do sítio reativo, assim como outras regiões conservadas da seqüência, podem também auxiliar na formação do intermediário acil com os resíduos de serina da posição 195 das serinoproteases. A região do sítio reativo foi confirmada pelos dados obtidos a partir da seqüência proposta por densidade eletrônica apresentada a seguir. Alguns ajustes foram necessários de forma encaixar a seqüência primária no modelo tridimensional final obtido por densidade eletrônica a partir de cristais do inibidor CTI.

Caesalpinia pulcherrima, *Swartzia pickellii* e *Delonix regia* pertencentes à subfamília Caesalpinoideae bem como *Copaifera langsdorffii* apresentaram principalmente inibidores do tipo Kunitz, confirmando os dados de Norioka et al. (1988), que discutiram que as espécies da subfamília Caesalpinoideae, considerada intermediária no estágio de evolução, apresentavam principalmente inibidores do tipo Kunitz, enquanto as espécies da subfamília Papilionoideae apresentavam tanto inibidores do tipo Kunitz quanto inibidores de Bowman-Birk. Estes resultados sugerem fortemente a relação entre a família de inibidores encontrados em leguminosas com a evolução destas plantas.

03. ESTUDO CRISTALOGRÁFICO E TRIDIMENSIONAL DO INIBIDOR CTI

CRISTALIZAÇÃO DO INIBIDOR

O inibidor intacto foi rapidamente cristalizado pelo método de difusão de vapor em gota pendurada a 291 °K em tampão acetato de sódio 0.1 M, pH próximo a 4.3, usando PEG 4000 (20-25 %) como precipitante (**Figura 01**). Cristais pequenos cresceram após quatro dias. A presença de ambas subunidades do inibidor CTI no material cristalizado pode ser confirmada pelo gel de eletroforese de poliacrilamida SDS-Tricina.

Os dados da difração de raios-X foram coletados de cristais congelados medindo 0.1 x 0.07 x 0,03 mm usando radiação Síncrotron com comprimento de onda de 1.38 Å. O pequeno tamanho do cristal limitou a intensidade de difração e o padrão de resolução. Com o intuito de otimizar a coleta de difração de raios-X, a radiação Síncrotron foi alterada para 1.535 Å.

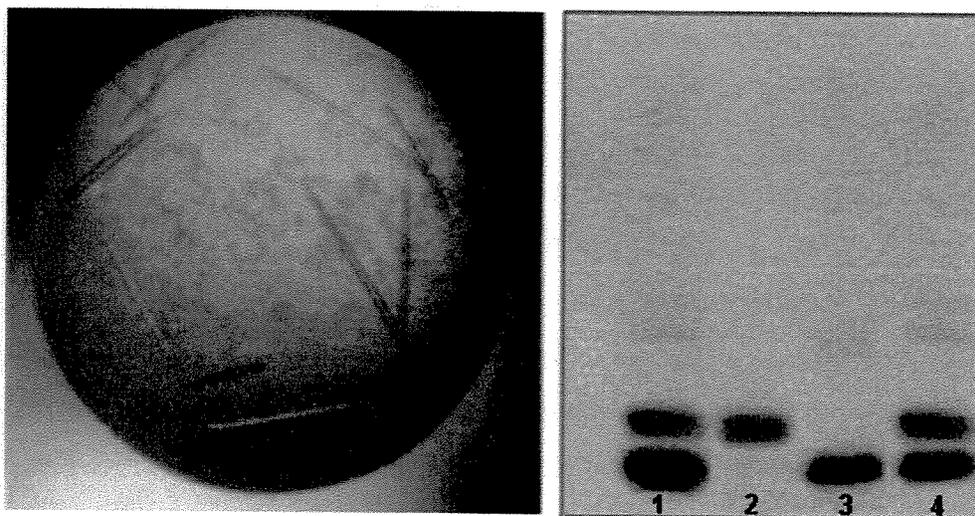


Figura 01 – Cristal do inibidor de protease de *C. langsdorffii* e Gel de eletroforese SDS-PAGE. À esquerda têm-se os cristais do inibidor CTI de sementes de Copaíba obtidos pelo método de difusão de vapor em tampão acetato de sódio, usando PEG 4000 (20-25%) como precipitante. À direita temos o gel de eletroforese usando SDS-Tricina 16,5%. 1) Amostra do inibidor extraído de sementes de *C. langsdorffii*. 2 e 3) evidenciam as subunidades do inibidor purificadas por HPLC usando coluna C18 de fase reversa. 4) Amostra do cristal do inibidor dissolvido.

Uma segunda coleta de dados foi realizada de forma diferente a partir de um único cristal e avaliada. Os cristais de CTI foram então melhor resolvidos usando uma resolução de 1,83 Å. Através deste método foi possível obter cristais pertencentes ao grupo especial tetragonal com dimensões de $a = b = 58.71$ e $c = 93.75$. Considerando uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa para CTI, o volume celular calculado foi de $3.25 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ e o coeficiente Matthews calculado foi de $2,03 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$. Estes dados indicam a presença de um único tipo de molécula assimétrica de CTI na unidade celular.

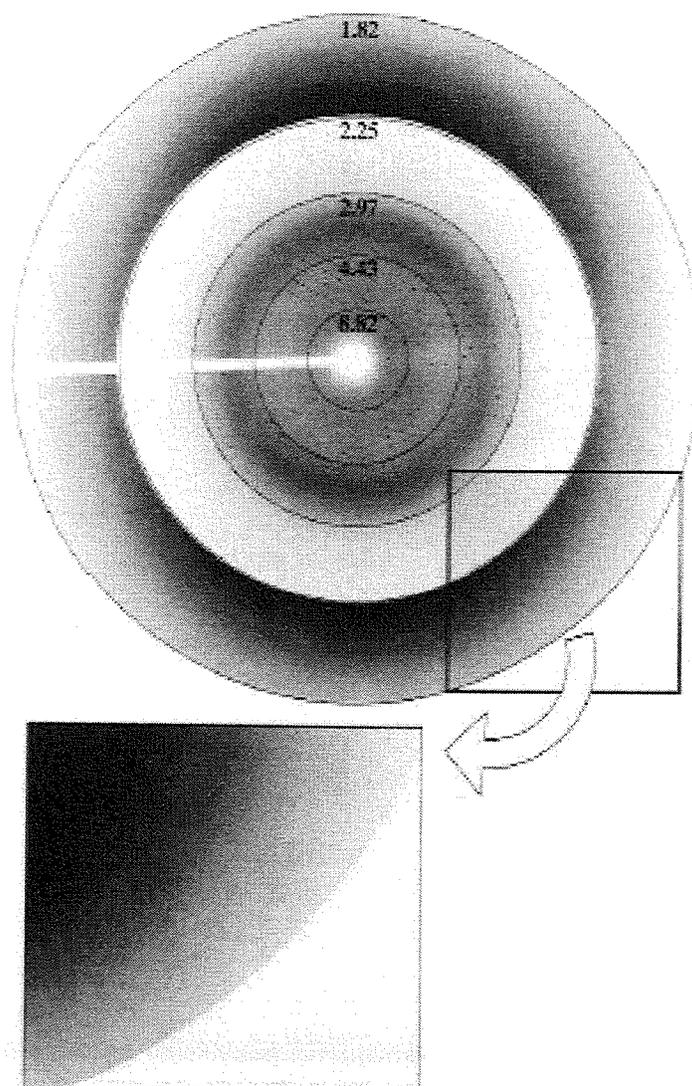


Figura 02 - Padrão de difração do cristal do inibidor CTI. A área externa da figura de difração (entre os anéis de resolução 2.25 e 1.82 Å) é mostrada quatro vezes mais saturada do que a parte interna da figura. No detalhe ampliado da parte externa da figura, observam-se reflexões até a resolução de 1.83 Å.

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Encontrou-se uma homologia N-terminal bastante significativa de CTI com o inibidor de Kunitz extraído das sementes de *Erythrina caffra*. Mas o inibidor de *Erythrina* Tem 170 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 22kDa, enquanto o inibidor CTI, segundo SDS-PAGE indicava duas cadeias de 11 e 9 kDa (20 kDa). Tentou-se resolver a estrutura do inibidor extraído das sementes de Copaíba (CTI) utilizando-se a técnica de substituição molecular, mas todas as tentativas apresentaram soluções não claras. Paralelamente, foram preparados cristais e derivados do inibidor CTI com o objetivo de resolver a estrutura por substituição isomorfa ou usando a técnica *ab initio*. Foram preparados e coletados dois derivados, um com césio e outro com iodo. Com os dados coletados para os derivados e para um cristal nativo, utilizando a técnica de “*quick cryo soaking*”, foi resolvida a estrutura do inibidor CTI. A Tabela abaixo resume o tratamento estatístico para o cristal de CTI coletado segundo Krauchenco et al. 2001.

Tabela 01 - Coleta de dados do cristal de CTI e tratamento estatístico. Os valores estatísticos de alta resolução são mostrados entre parênteses.

Space group	$P4_3(1)2_12$
Unit-cell dimensions (Å)	
<i>a</i> = <i>b</i>	58.86
<i>c</i>	93.83
Wavelength (Å)	1.535
Crystal-to-detector distance (mm)	100
Resolution range (Å)	25.3–1.83 (1.87–1.83)
No. of reflections	123604
No. of unique reflections	15024
Redundancy	4.0
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	23.6 (3.3)
Mosaicity (°)	0.5
Multiplicity	8.2 (5.4)
No. of images collected	100
Oscillation per image (°)	1.3
Completeness (%)	99.7 (97.6)
R_{merge} (%)	8.9 (50.8)

ARQUITETURA GLOBAL DO MODELO TRIDIMENSIONAL DE CTI

No modelo final de CTI observam-se doze fitas betas antiparalelas interconectadas por longos *loops* ou alças. (**Figura 03A**), formando um arranjo estrutural conhecido por beta-barril, consistindo de seis β -harpins de duas fitas beta cada, três das quais formam uma estrutura na forma de um barril- β , enquanto as demais formam uma tampa triangular sobre o barril. A estrutura tridimensional de CTI pode ser subdividida em três partes aproximadamente iguais (domínios) relacionadas por um pseudo-eixo triplo paralelo ao eixo central do barril.

Cada unidade de repetição (domínio) compreende aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, dos quais 30 resíduos formam 4 fitas- β s e os outros 30 formam os *loops* responsáveis por conectar as fitas- β s, estruturalmente organizada como $L_n^1\beta_n^1L_n^2\beta_n^2L_n^3\beta_n^3L_n^4\beta_n^4 = T_n$. As regiões repetidas foram nomeadas diferentemente da nomenclatura padrão estabelecida por McLachlan (1979), como T₁, T₂ e T₃ no lugar de A, B e C, de forma diferenciar das letras utilizadas para designar as cadeias A e B do inibidor CTI de sementes de Copaíba.

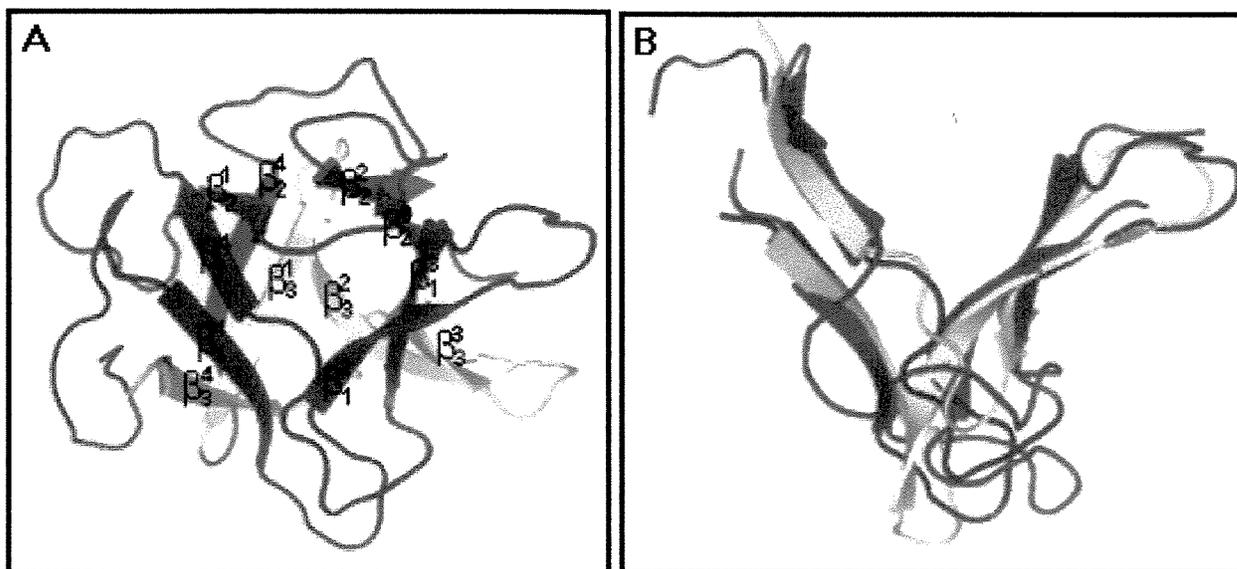


Figure 03 - A): Modelo de CTI mostrando a estrutura do tipo barril beta formada por três subdomínios estruturais repetidos T₁, T₂ e T₃, em azul, vermelho e amarelo respectivamente. **B):** Sobreposição dos domínios T₁, T₂ e T₃ usando os átomos de carbono C^α. O desvio entre os subdomínios foi de 1.5Å entre T₁ e T₂, 1.9Å entre T₁ e T₃ e 1.7Å entre T₂ e T₃.

Quando os três subdomínios de CTI são sobrepostos **Figura 03 B**, observa-se uma concordância particularmente boa nas regiões das fitas- β s, mas não nas regiões de *loop* interconectante. Quando a sobreposição foi realizada usando os 30 átomos carbono- α s (C^α), que compõem uma folha beta de cada subdomínio foi possível calcular o desvio entre os subdomínios. Entre T_1 e T_2 foi de 1.5 Å, entre os subdomínios T_1 e T_3 foi 1.9 Å e entre T_2 e T_3 foi de 1.7 Å.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO MODELO DE CTI

Os elementos da estrutura secundária foram determinados usando o programa PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) utilizando como base o padrão das pontes de hidrogênio. A folha- β 3 é composta de duas fitas- β s entre a cadeia A e B, formando uma interface de contato entre as porções N e C-terminais das cadeias polipeptídicas independentes. A folha- β 1 é composta por oito fitas- β s tanto da cadeia A quanto da cadeia B, estando localizada na região central da proteína e formando a estrutura de barril- β . A folha- β 2 é formada por duas fitas- β s da cadeia A e está localizada entre os motivos T1 e T2.

Essas folhas- β s são estabilizadas por uma extensa rede de pontes de hidrogênio que mantém a rigidez e a estabilidade da estrutura, a despeito dessa ser composta por duas cadeias polipeptídicas independentes. Com base no padrão de pontes de hidrogênio, identificou-se que as regiões de *loops* na superfície da molécula não possuem uma estrutura desorganizada, mas sim predominantemente formadas por β -turns. Existe um total de 16 β -turn na estrutura de CTI.

CTI É CONSTITUÍDO POR DUAS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS

CTI foi inicialmente descrito como dois inibidores diferentes. Encontrou-se uma homologia N-terminal bastante significativa com o inibidor de Kunitz, extraídos das sementes de *Erythrina caffra*, mas esse inibidor tem 170 resíduos de aminoácidos em uma cadeia única (cerca de 22kDa) e o inibidor CTI, segundo SDS-PAGE indicava duas cadeias de 11 e 9 kDa (20 kDa) não ligadas covalentemente.

A **Figura 04A** mostra o mapa final de densidade eletrônica para a região entre o C-terminal da cadeia A e o N-terminal da cadeia B, onde pode ser visto claramente uma ruptura (gap) entre elas. A sobreposição das regiões de *gap* com o *loop* equivalente de outros membros da família do tipo Kunitz, é mostrado na **Figura 04B**.

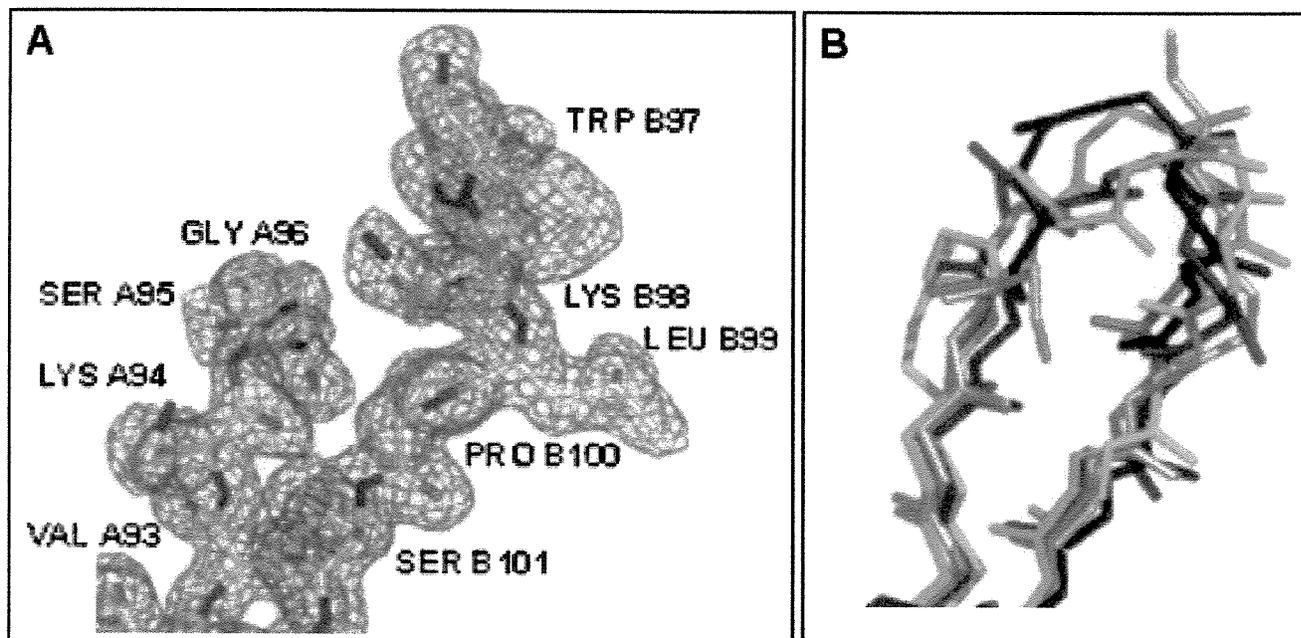


Figura 04 - A) Mapa de Densidade Eletrônica da região de ruptura entre as duas cadeias polipeptídicas (11 e 9 kDa). **B)** Sobreposição dos átomos da cadeia de 11kDa de CTI (amarelo) em comparação com a mesma região de STI (vermelho), ETI (laranja), WCI (verde), WBA (preto) e BASI (azul) evidenciando a continuidade da cadeia nesta região em todos membros exceto em ETI.

O INIBIDOR CTI APRESENTA APENAS UMA PONTE DISSULFETO

A sobreposição dos mapas de diferença anômala e o da densidade eletrônica da **Figura 05** evidenciam apenas uma ponte dissulfeto para a molécula de CTI, sendo esta localizada na posição 40-91. A segunda ponte dissulfeto característica dos inibidores da família do tipo Kunitz está ausente no inibidor CTI, como pode ser evidenciado pela ausência do sinal anômalo. Os resíduos B130 e B136 são uma serina e um ácido aspártico, respectivamente.

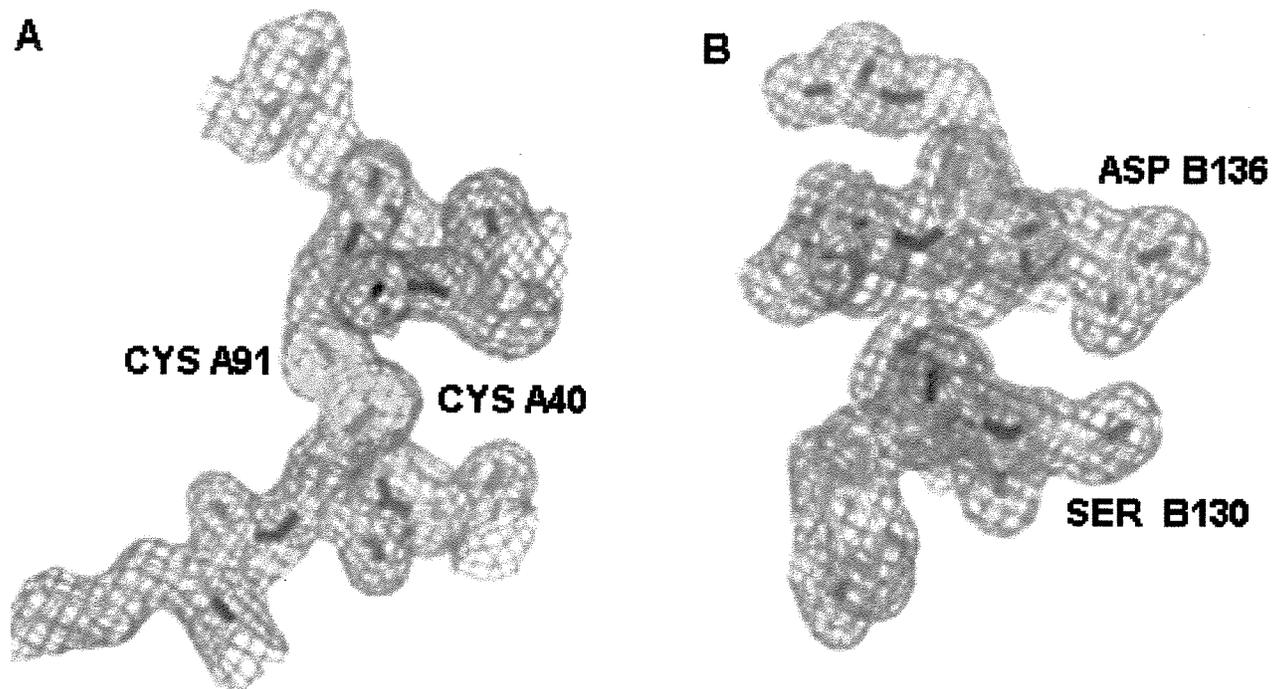


Figura 05 - A) Sobreposição dos mapas de densidade eletrônica a 1.2σ (contorno em azul) e diferença anômala a 7σ (contorno em verde), confirmando a presença dos átomos de enxofre formando a única ponte dissulfeto desse inibidor localizada entre os resíduos A40 e A84. **B)** Sobreposição dos mapas de densidade eletrônica a 1.2σ (contorno em azul) e ausência sinal anômalo na região próxima a segunda ponte dissulfeto.

DISCUSSÃO

Muitos dos processos danosos à saúde humana e, até mesmo processos essenciais ao metabolismo, são mediados por enzimas proteolíticas com uma grande versatilidade de funções. O estudo de proteínas capazes de regular a atividade dessas proteases mostra-se de amplo interesse, multiplicando a possibilidade de sua aplicação. Estes estudos têm sido de extrema importância para se elucidar a natureza da estrutura química das enzimas, emergindo informações de como as enzimas se ligam ao seu substrato, retratando o possível mecanismo de catálise e, permitindo a possibilidade de se desenvolver compostos que possam inibir enzimas relacionadas a alguma doença (Richardson 1991; Ryan, 1990). Fato este, que já ocorre na indústria farmacêutica, na síntese de novos fármacos, como por exemplo, os inibidores de transcriptase e os inibidores de protease virais que atuam bloqueando a replicação do vírus HIV.

A combinação de técnicas da biologia molecular, bioquímica, biofísica e biologia estrutural vem fornecendo ferramentas extremamente poderosas para compreender e manipular as moléculas. Com o conhecimento científico disponível, estamos atualmente num ponto crucial para explorar possibilidades que estavam somente limitadas a nossa imaginação. Tal desenvolvimento não era possível há uma década atrás. Atualmente, podemos modificar a especificidade de enzimas, ou mesmo projetar e criar moléculas que não existem na natureza, tais como novos substratos, inibidores, anticorpos com atividade catalítica, enzimas com especificidade alterada e enzimas que funcionem sob condições físicas e químicas extremas, tais como temperatura, pH e salinidade (Ducruix & Giegé, 1992; Deutscher, 1990).

Essas moléculas têm grande potencial de aplicação em indústrias biotecnológicas para a produção de fontes alternativas de materiais e energia, na medicina para a criação e produção de drogas e, na agricultura para a produção de novas colheitas resistentes com alto valor nutricional. O desenvolvimento destas técnicas biotecnológicas e da engenharia macromolecular fomenta a necessidade crescente em elucidar as estruturas tridimensionais de proteínas e associação de multi-macromoléculas. A cristalografia, através do método de difração de raios X, provou ser uma ferramenta útil para elucidar detalhadamente as estruturas dessas macromoléculas (Ducruix & Giegé, 1992; Deutscher, 1990).

As características comuns da estrutura terciária das proteínas revelam informações sobre as suas funções biológicas e suas origens evolutivas. A estrutura terciária de uma proteína descreve o dobramento da estrutura secundária e especifica as posições de cada átomo na proteína, incluindo as cadeias laterais. As estruturas terciárias conhecidas das proteínas têm sido obtidas por cristalografia de raios-X e as coordenadas atômicas da maioria dessas estruturas, estão depositadas em bancos de dados como o *Protein Data Bank* (PDB). Tais dados podem ser acessados via Internet (<http://www.pdb.bnl.gov>), permitindo a análise e a comparação das estruturas terciárias de uma variedade de proteínas.

Os resultados do gel de eletroforese SDS Tricina (**Figura 01**) e o sequenciamento N-terminal já haviam indicado que o inibidor CTI era constituído de duas cadeias polipeptídicas, com massa molecular relativa de 11 e 9 kDa. Essas duas cadeias, provavelmente, se encontram ligadas por interações fracas (não covalentes), formando um heterodímero de massa molecular de aproximadamente 20 kDa. As duas subunidades foram purificadas através de cromatografia de fase reversa utilizando coluna C18 acoplada em sistema HPLC.

A existência de duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente explica a presença das bandas 11 e 9 kDa observadas em gel SDS-Tricina e espectrometria de massas. Explica também porque todas as tentativas em cristalizar as cadeias polipeptídicas separadas do inibidor CTI não deram resultados promissores. A maior parte dos inibidores do tipo Kunitz é constituída por cadeia polipeptídica única e contínua. Curiosamente, dois inibidores ETI e agora CTI fogem a este padrão, tão comum nos demais representantes da família tipo Kunitz.

O inibidor ETI apresenta resíduos adicionais na região (*loop*) em questão, enquanto o inibidor CTI mostra ausência de alguns resíduos em função da falta de densidade eletrônica na estrutura final. Estas evidências são fortes indicativos de que o *loop* correspondente em CTI foi clivado ou encontra-se mais flexível com uma certa desordem estrutural natural. CTI representa a primeira estrutura de inibidor do tipo Kunitz constituída por duas cadeias não covalentemente ligadas.

O enovelamento do tipo β -barril foi originalmente descrito na estrutura de STI (Song & Suh 1998) e tem sido observado em um número significativo de proteínas não relacionadas funcionalmente. Nesta classe de proteínas inclui os fatores de crescimento de fibroblastos (Zhu et al., 1991; Plotnikov et al., 2001), interleucinas α and β (Graves et al.,

1990; Priestle et al., 1988), receptores agonistas de interleucina (Schreuder et al., 1997), toxinas do tipo ricina-like (Rutenber et al., 1991), lectina de plantas (Transue, 1997), xilanase 10A (Notenboom et al., 2002), domínio receptor de manose com N-terminal rico em cisteína (Liu et al., 2000) e proteínas ligante a actina (Habazettl et al., 1992; Ono et al., 1997).

Esta família de proteínas possui funções e localização celular distintas, compartilham pequenas ou nenhuma similaridade detectável na seqüência primária e apresentam mecanismo de interação distinta em relação ao diferentes ligantes. A arquitetura tridimensional do inibidor CTI (**Figura 03A**) relevou ser composta apenas por estrutura do tipo beta, em forma de cálice, conhecida como barril beta (Murzin et al., 1992; Swindells & Thornton, 1993). Embora não haja similaridade seqüencial para os três subdomínios, sugere-se que o enovelamento na forma de beta barril tenha originado de um progenitor homotrímico que tivesse submetido a eventos sucessivos da duplicação gênica (Mukhopadhyay, 2000).

Estudos filogenéticos sugerem que a causa da conservação estrutural do enovelamento do tipo β -barril entre proteínas não relacionadas pode ser uma consequência da possível duplicação do gene em algumas superfamílias de proteínas. Estes resultados promovem suficientes evidências estatísticas de que as proteínas com estrutura do tipo beta barril são homólogas e se originaram de um ancestral comum que divergiram durante a evolução (Ponting & Russel, 2000).

Uma das características distintivas para os inibidores da família Kunitz é a presença de duas pontes dissulfeto que são conservadas em quase todos os membros desta família. Em contraste, o Inibidor CTI contém somente uma ponte dissulfeto localizado entre o A 40 e A 91. A existência de uma única ponte dissulfeto na estrutura do inibidor CTI foi confirmada pelo mapa de diferença anômala calculado para próximo a região das pontes dissulfeto presente em STI e outras membros da família. A sobreposição dos mapas de diferença anômala e o da densidade próximo destas regiões em CTI é evidenciado na **Figura 05**.

A pesquisa por homologia foi realizada usando a seqüência do inibidor CTI no BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sendo encontradas seqüências de vários inibidores com alta homologia (dado mostrado anteriormente). Um alinhamento entre eles revela que existe apenas um único membro na família Kunitz WBA (McCoy & Kortt, 1997) que não possui a primeira ponte dissulfeto em todas as outras seqüências comparadas. A ponte dissulfeto nessa posição une os subdomínios T2 e T3. A primeira ponte dissulfeto conecta e

fixa o loop reativo dos inibidores, contribuindo para manutenção da conformação canônica necessária para a atividade inibitória. WBA não apresenta a primeira ponte dissulfeto, e consta somente da ponte entre os resíduos 135 e 141. WBA é o único membro que não apresenta nenhuma atividade contra tripsina, quimotripsina, subtilisina ou alfa-amilase e é classificado como uma albumina (Matthews, 1977).

Isto é um forte indício de que a ausência da primeira ponte dissulfeto como ocorrem em WBA contribui para a falta da atividade inibitória. Estes resultados convergem para uma melhor compreensão de como a localização das pontes dissulfeto contribui significativamente com um papel estrutural que reflete funcionalmente na atividade inibitória para a maioria dos membros dos inibidores do tipo Kunitz. Entretanto, a segunda ponte dissulfeto ausente em CTI, demonstra um aspecto interessante, visto que, embora seja conservado na maioria dos inibidores da família Kunitz pode ser ausente em alguns inibidores, assim como podem ser observados inibidores com três pontes dissulfeto. Isto reforça a hipótese de que a segunda ponte dissulfeto nesta posição não é fundamentalmente importante para a manutenção da estabilidade estrutural e atividade desses inibidores.

Entre outros aspectos é de se considerar alguns estudos demonstrando que inibidores do tipo Kunitz (STI) retêm sua atividade inibitória mesmo após a redução da segunda ponte dissulfeto, tornando-se inativo quando em seu estado inteiramente reduzido (Hung et al., 1994). A redução das duas pontes dissulfeto de ETI promoveu diminuição sensivelmente de sua atividade inibitória (Lehle et al., 1994). Estes fatos corroboram que a presença da primeira ponte dissulfeto é essencial para a atividade inibitória, enquanto a segunda não seja.

04. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INIBIDOR DE TRIPSINA (CTI)

INTERAÇÃO DE CTI COM A TRIPSINA

Com o objetivo de entender melhor como ocorre a interação do inibidor CTI com a protease tripsina bovina, experimentos conjugados (determinação da constante de inibição, cromatografia de gel filtração e gel de eletroforese SDS-Tricina) foram realizados como evidenciado na **Figura 01** e **02**. O inibidor CTI e sua subunidade CTI-I possuidora do sítio reativo, como demonstrado nos capítulos anteriores foram submetidas ao teste de inibição da atividade enzimática com tripsina bovina. A **Figura 01** mostra a curva de inibição da tripsina bovina, na presença de quantidades crescentes do inibidor CTI e de sua subunidade CTI-I.

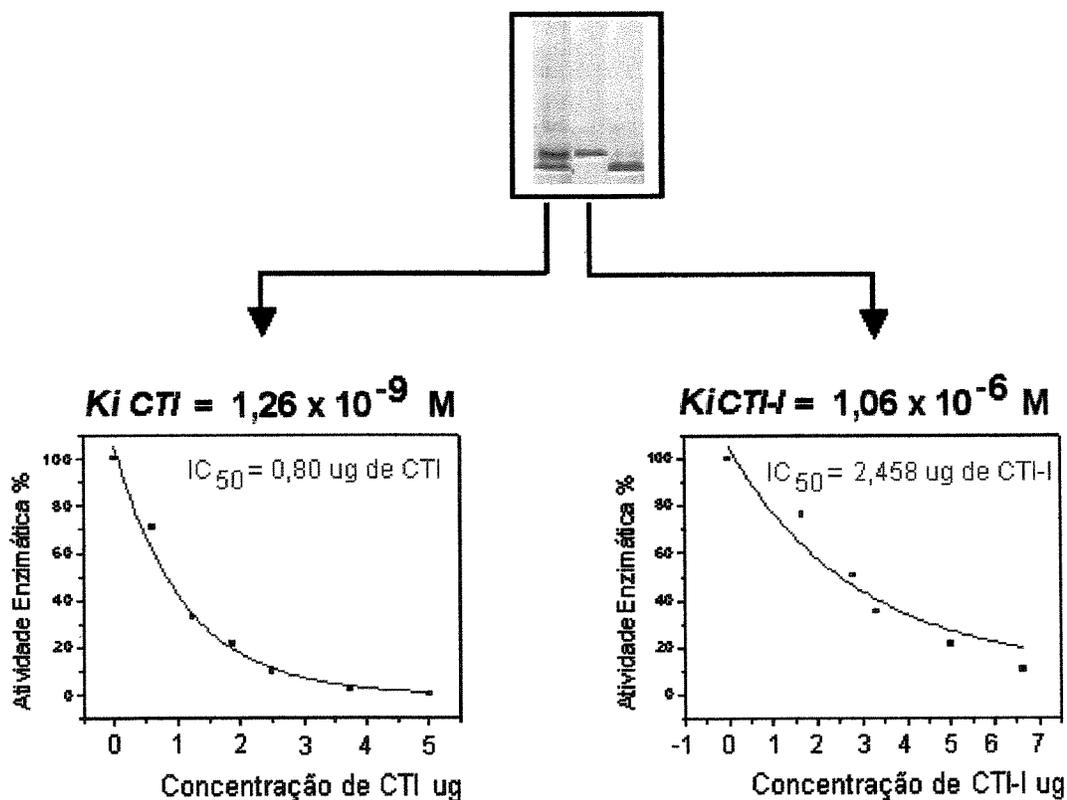


Figura 01 - Gel de eletroforese SDS-Tricina e Curva de Inibição da serinoprotease tripsina por CTI e sua subunidade CTI-I. As respectivas constantes de inibição (K_i) e IC_{50} para o Inibidor CTI e sua subunidade CTI-I são demonstrados.

A atividade enzimática para CTI foi determinada pela hidrólise do substrato cromogênico BAPNA, após a incubação por 30 minutos em tampão Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,0, a 37 °C, espectrofotometricamente com a finalidade de estimar a atividade residual da tripsina no ensaio e, conseqüentemente, a eficiência inibitória.

Após obter as curvas para a enzima acima, foi possível determinar as constantes de inibição de acordo com o procedimento descrito por Morrison (1982) e adaptada ao programa ENZIFTER. A determinação da constante de inibição (K_i) para CTI $1,26 \times 10^{-9}$ M foi realizada segundo o modelo de inibição do tipo *slow-tight binding* utilizando a equação definida por Knight (1986). A K_i para a subunidade CTI-I foi de $1,06 \times 10^{-6}$ M, indicando que a purificação em coluna C18 é extremamente agressiva para a estrutura, mas mantém uma atividade inibitória.

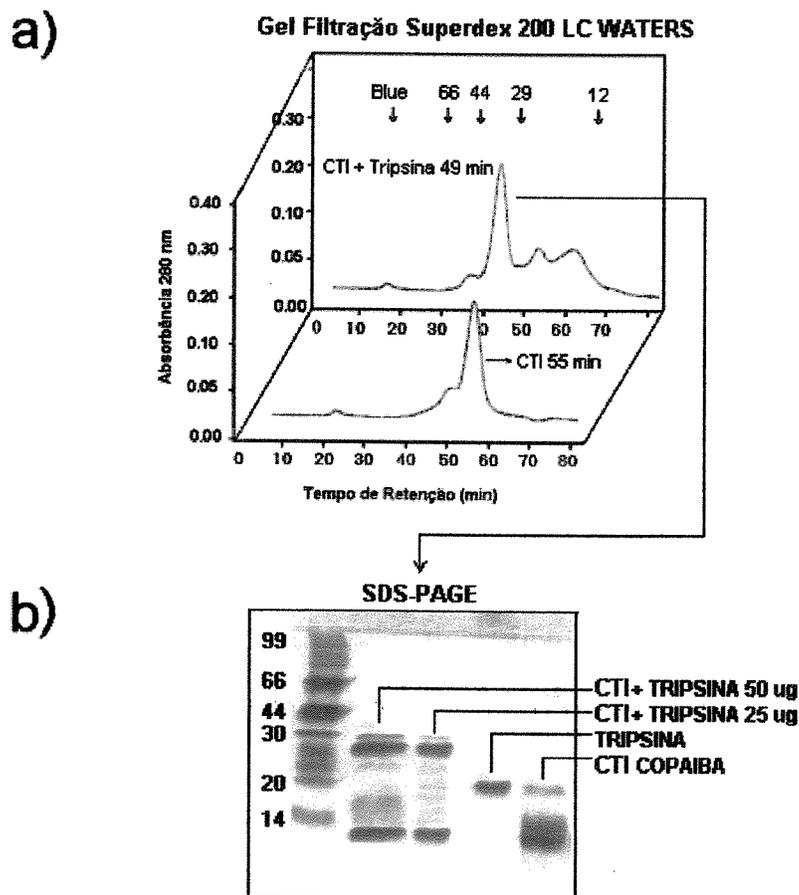


Figura 02 – Estudo do complexo enzima tripsina e inibidor CTI por cromatografia de exclusão e gel de eletroforese SDS_PAGE. a) Cromatografia de gel filtração de CTI e CTI + Tripsina em Superdex 200 equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M NaCl 0,01 M pH 8,0. b) SDS-PAGE de CTI, Tripsina e CTI + Tripsina corado por impregnação por prata.

Alíquotas contendo concentrações conhecidas de CTI, tripsina e o complexo de CTI + tripsina foram cromatografadas em coluna Superdex 200, previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0.01M NaCl 0.01M pH 8.0. CTI foi eluído da coluna com uma massa molecular similar aquela observada para a tripsina, aproximadamente 23 kDa. Quando CTI + tripsina foi submetido à mesma cromatografia, um pico próximo a 34 kDa foi eluído, não sendo observado o pico de 46 kDa como se esperava, indicando que CTI inibe tripsina numa estequiometria de 1:1 (**Figura 02a**) e que possivelmente suas subunidades se separam na formação do complexo.

Quando o pico do complexo proveniente da cromatografia de gel filtração foi submetido a uma eletroforese SDS-Tricina, observamos duas bandas de massa molecular aproximadamente 30 e 29 kDa que seria referente ao complexo subunidade CTI-I + tripsina e uma banda abaixo de 14 que corresponderia a subunidade CTI-II (**Figura 02 b**).

RELAÇÃO DO LOOP REATIVO E FUNÇÃO DO INIBIDOR CTI

O *loop* com o sítio reativo de CTI está localizado na subunidade CTI-I e é formado pelos resíduos (59, Phe-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Ser-Lys-Tyr-Ile-Ser, 69) desde a posição p6 até a posição p5' com o resíduo arginina 64 ocupando a posição P1. CTI apresenta a conformação canônica para o *loop* reativo e todos os resíduos são perfeitamente superpostos.

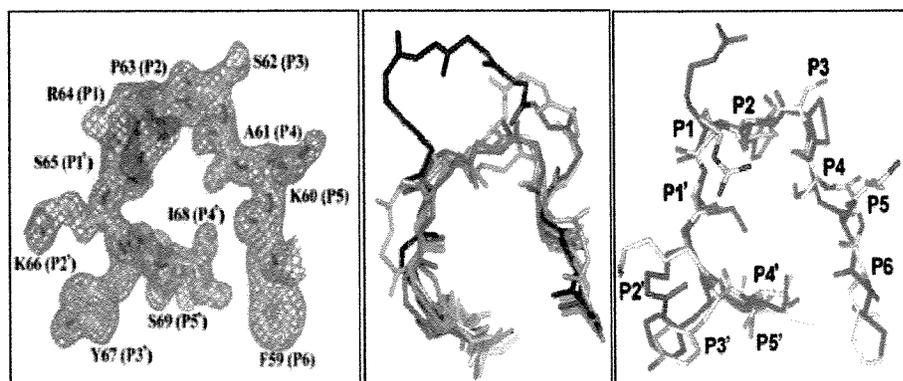


Figura 03 - Comparação estrutural da conformação canônica para o loop do sítio reativo entre membros da família STI Kunitz. À esquerda observa-se o mapa de densidade eletrônica para a região do sítio reativo. No centro, tem-se a cadeia principal de CTI (amarelo), STI (vermelho), ETI (laranja), WCI (verde), WBA (preto) e BASI (cyan). Na mesma orientação à direita são mostradas também as cadeias laterais de CTI (amarelo) e STI (vermelho).

FORMAÇÃO DO COMPLEXO TRIPSINA-INIBIDOR CTI

CTI tem uma significativa atividade inibitória contra tripsina, com uma constante de dissociação de 1.2 nM. Com o objetivo de compreender a relação de interação entre inibidor-enzima a estrutura tridimensional de CTI, discutida anteriormente, foi comparada com as estruturas de STI livre (código PDB 1 AVU) e STI complexado com tripsina porcina (código PDB 1 AVW). CTI adota uma conformação canônica para o *loop* reativo semelhante àquela observada para os inibidores STI e ETI. Um aspecto que chama a atenção é que nos inibidores que não estão complexados, o *loop* reativo apresenta uma estrutura secundária muito bem definida, veja a seta na **Figura 04**. Já no caso do complexo STI-Tripsina, as interações entre os sítios ativo e reativo da tripsina e do inibidor, respectivamente resultam numa mudança drástica na conformação do *loop* reativo de STI formando uma fita- β que pareia com outra fita- β da tripsina formando uma folha- β .

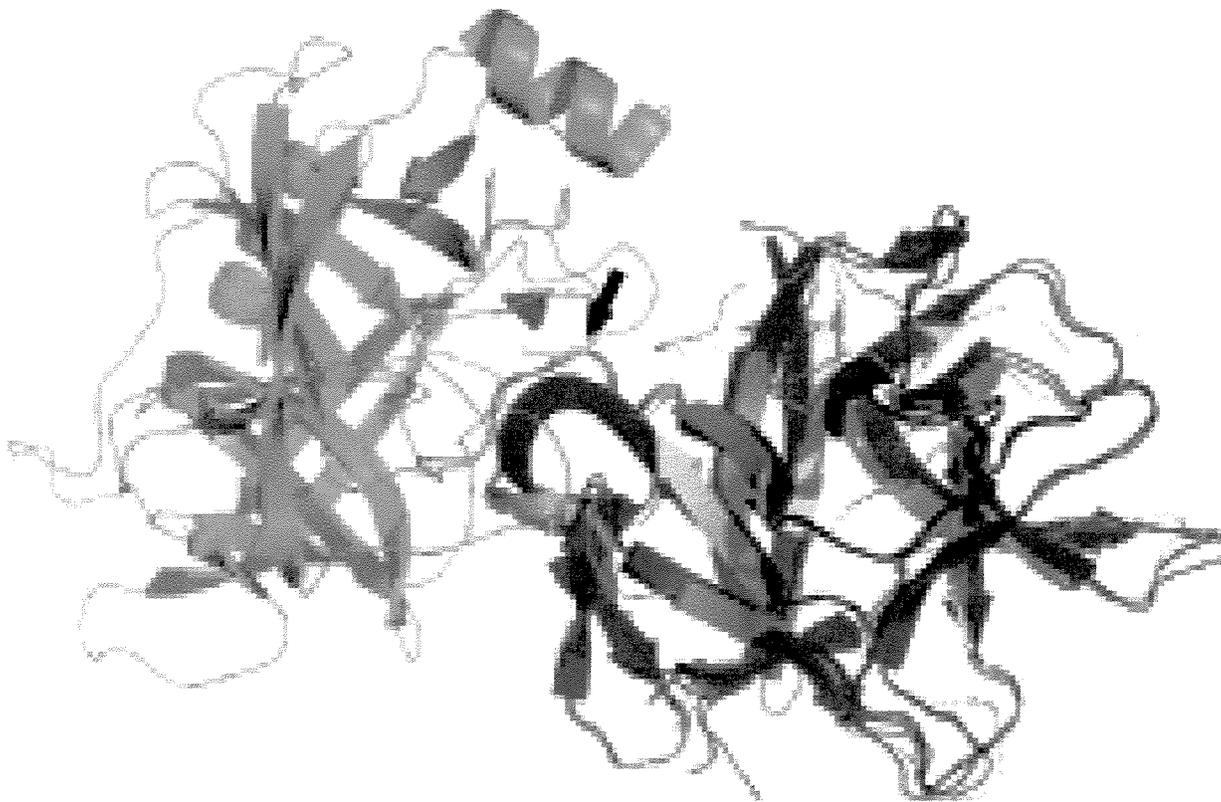


Figure 04 - Sobreposição de CTI (amarelo) com o STI complexado com a tripsina (código 1AVW PDB) (azul) e com STI livre (código 1AVU PDB) (vermelho). A seta indica o *loop* que apresenta o sítio reativo.

EFEITOS DE REAGENTES MODIFICADORES NA ATIVIDADE DO INIBIDOR CTI**Medidas de fluorescência de CTI após a pré-incubação com os modificadores**

O espectro de emissão foi determinado após o período de pré-incubação com os modificadores (**Figura 05**). Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, observou-se alteração da intensidade de fluorescência em função de alguns modificadores e um concomitante deslocamento do pico de emissão para o vermelho (de 330 para aproximadamente 370 nm) quando na presença de PGO (modificador de arginina). Para os demais modificadores este deslocamento foi menos significativo.

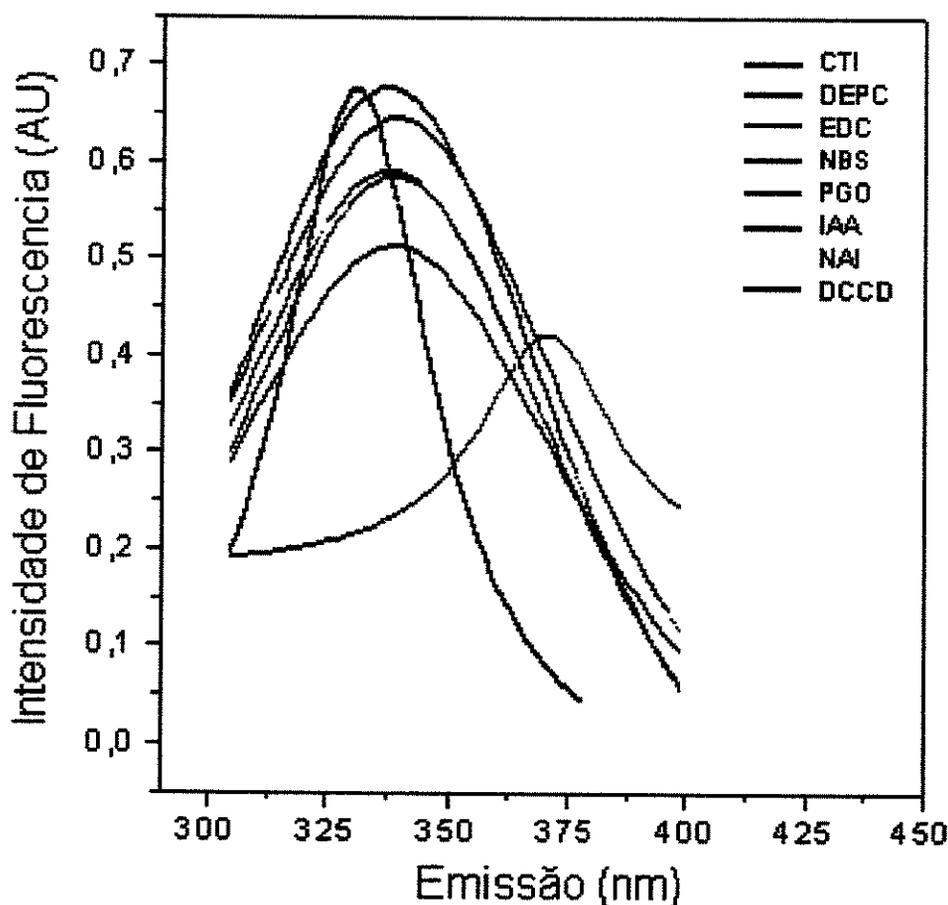


Figura 05 – Espectro da variação da intensidade de fluorescência em função de diversos modificadores. As amostras em concentração de $10\mu\text{g/mL}$ foram excitadas a 293nm . O inibidor CTI foi pré-incubado na presença de modificadores químicos na concentração de 10mM .

Atividade inibitória de CTI após a pré-incubação com os modificadores

O efeito dos reagentes modificadores não mostrou ser dependente da temperatura de pré-incubação (dados não mostrados) sendo os experimentos conduzidos a uma temperatura de 37 °C (**Tabela 01**). Uma inibição pouco significativa foi observada para os modificadores N-bromosuccinamida (NBS), ácido iodoacético (IAA) e N-acetilimidazol (NAI), modificadores químicos específicos para triptofano, tirosina, cisteína, metionina e histidina, mostrando que, possivelmente, estes aminoácidos não têm importância significativa para a atividade inibitória de CTI.

Na **Tabela 01** nota-se uma inibição pouco significativa da atividade de CTI sobre a tripsina pelo modificador ácido iodoacético. Dietil-pirocarbonato (DEPC) reage com resíduos de histidina e promoveu uma inibição, juntamente com N,N'-díciclohexicarbodiimida (DCCD) que reage com resíduos Asp em torno de 38%. A inibição do N-bromosuccinamida (NBS) pode ser devido à interação do modificador também com histidina.

O modificador fenilglioxal (PGO) que reage especificamente com resíduos de Arg, foi o que apresentou maior inibição da atividade de CTI. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC) mostrou-se o segundo inibidor mais potente da atividade do inibidor, indicando que grupos carboxilas dos resíduos de Glu ou Asp são importantes para a atividade inibitória. Em função da inibição mais significativa para os modificadores PGO, EDC e DEPC, eles foram selecionados para um estudo de cinética mais detalhado.

Tabela 01 - Efeito de reagentes modificadores de aminoácidos na atividade inibitória da tripsina pelo inibidor CTI de sementes de Copaíba.

Reagente Modificador	Grupo Específico	Atividade Inibitória Relativa de CTI (%)
Fenilglioxal (PGO)	Arg	81,54
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC)	Carboxil (Glu, Asp)	48,51
Dietil-pirocarbonato (DEPC)	His (Tyr)	38,7
N,N'-díciclohexicarbodiimida (DCCD)	Asp	38,4
N-bromosuccinamida (NBS)	Trp, Tyr (His)	33,3
Ácido iodoacético (IAA)	Cys (Tyr, Met)	22,9
N-acetilimidazol (NAI)	Tyr (Amino)	26,5

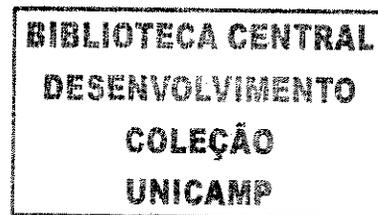
Cinética de inativação de CTI por DEPC

O inibidor CTI foi pré-incubado com diferentes concentrações de DEPC, e a atividade inibitória para tripsina foi monitorada utilizando BAPNA como substrato. A cinética de inativação de CTI por DEPC mostrou-se muito complexa (dados não mostrados). Medidas de absorvância do inibidor CTI pré-incubado com diferentes concentrações de modificadores, foi efetuada de hora em hora por 4 horas com o objetivo de correlacionar a inativação com possíveis modificações em resíduos de histidina e tirosina que absorvem em 242 e 278 nm, respectivamente.

Cinética de inativação de CTI por EDC

Obteve-se uma inibição significativa na presença de EDC, sugerindo que a Glu e Asp podem estar envolvidos na atividade inibitória de CTI. De acordo com a **Figura 06** observou-se que a inativação de CTI foi do tipo concentração e tempo dependente. O padrão de inativação em função da concentração de EDC foi linear, sugerindo a formação de um complexo não reversível entre CTI e o modificador.

Através da inclinação da reta do gráfico da **Figura 06**, obteve-se o valor de $0,22 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ como sendo da constante bimolecular aparente de CTI na presença do reagente modificador, ou seja, é o valor da reatividade do agente modificador. A ordem da reação de inativação foi determinada de acordo com Levy et al. (1963) através do gráfico logaritmo de K_{app} versus logaritmo da concentração de EDC (**Figura 07**). Este gráfico ainda nos forneceu uma inclinação para a reta de 0,22, indicando que a ordem da reação de inativação foi de aproximadamente 0,25.



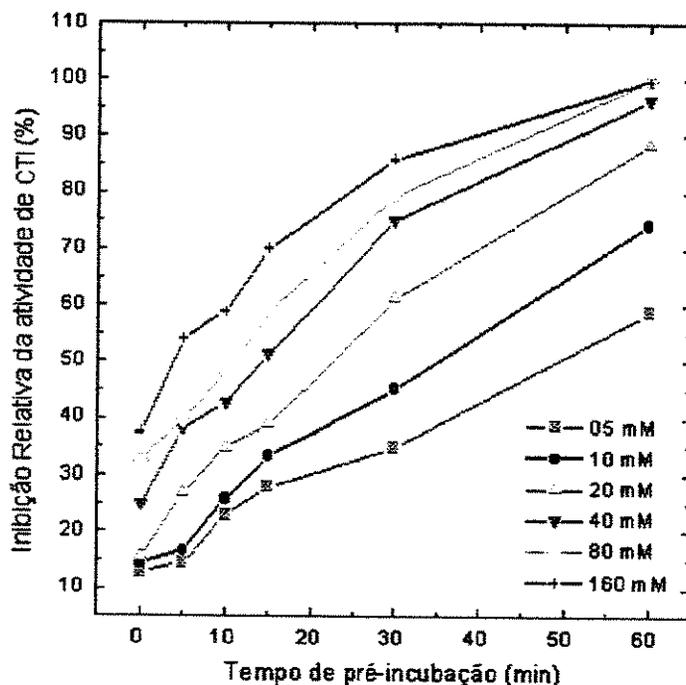


Figura 06 - Inativação do Inibidor CTI de sementes de Copaíba por EDC.

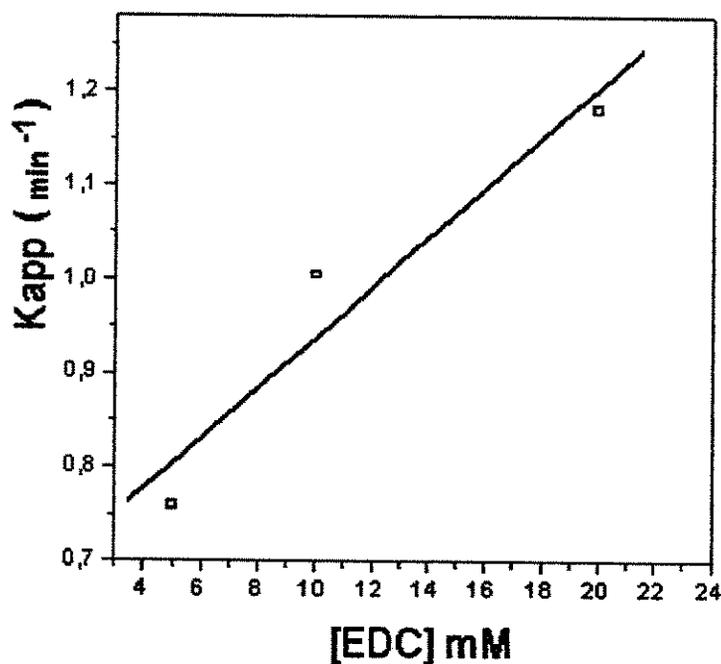


Figura 07 - Gráfico de dependência da constante aparente (K_{app}) de inativação em função da concentração de EDC. Os valores de K_{app} foram determinados através da inclinação das retas de cada concentração de EDC da Figura 06, pré-incubada em diferentes tempos.

O espectro de emissão de fluorescência de CTI, na ausência bem como na presença de concentrações crescentes do reagente modificador EDC (**Figura 08**), não foi afetado significativamente, embora tenha ocorrido a baixa da atividade inibitória de CTI nas concentrações de EDC utilizadas no experimento de medidas de fluorescência.

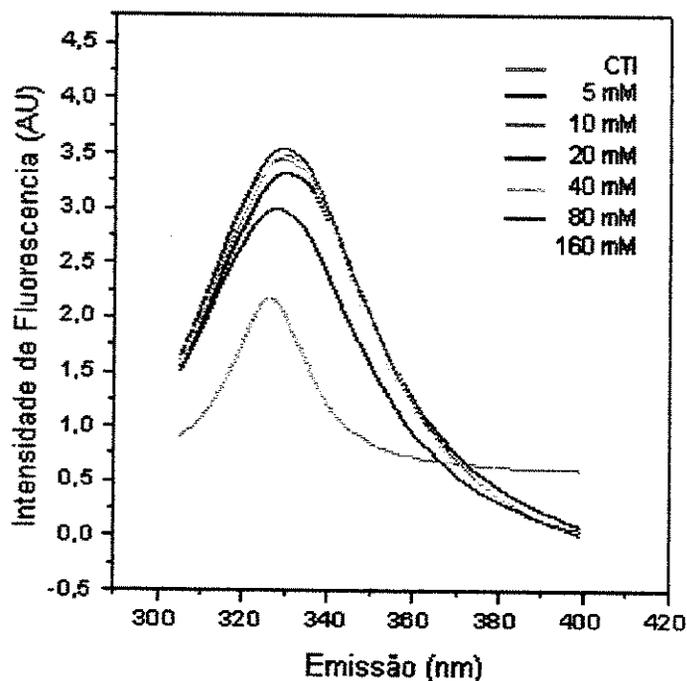


Figura 08 – Espectro de emissão de fluorescência do inibidor CTI pré-incubado com diferentes concentrações de EDC. O espectro de fluorescência foi obtido com uma concentração fixa de CTI (10 mg/mL) e várias concentrações de EDC (5 – 160 mM) em um volume total de 1 mL incubado a 25 °C por 24 horas. A fluorescência em igual concentração de EDC diluído em um volume de 1 mL, foi obtida, como controle.

Cinética de inativação de CTI por PGO

A inibição da atividade de CTI em aproximadamente 80 % pelo PGO confirma que o resíduo de arginina presente no *loop* reativo na posição P1, é fundamental para a atividade inibitória de CTI. O efeito de PGO na atividade do inibidor CTI (**Figura 09**) foi estudado em detalhe, mostrando ser tempo e concentração dependente, com constante aparente bimolecular de $1,3 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O padrão de inativação mostrou-se linear sugerindo

fortemente que nenhum complexo reversível entre o inibidor e o reagente foi formado (Figura 10).

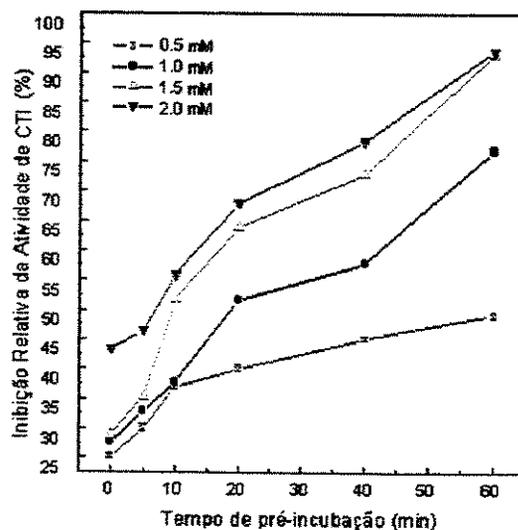


Figura 09 - Inativação do Inibidor CTI de sementes de Copaíba por PGO. O inibidor foi pré-incubado em diferentes tempos e concentrações do reagente modificador PGO. A atividade residual inibitória da tripsina foi expressa como porcentagem do controle na ausência do modificador.

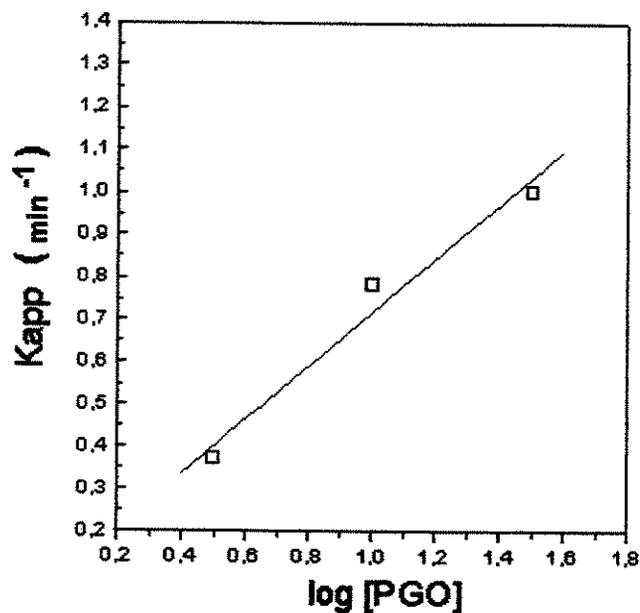


Figura 10 - Gráfico de dependência da constante aparente (K_{app}) de inativação de CTI em função da concentração de PGO. Os valores de K_{app} foram determinados através da inclinação das retas de cada concentração de PGO da Figura 09, pré-incubado em diferentes tempos.

DISCUSSÃO

CTI é um inibidor de tripsina possuidor de apenas uma ponte dissulfeto, e no aspecto de interação com protease, inicialmente acreditava-se na existência de dois inibidores de tripsina de baixa massa molecular. Contudo, a partir dos experimentos de determinação da estrutura primária e determinação da estrutura tridimensional, conclui-se que o inibidor CTI é uma molécula constituída por duas subunidades, onde o sítio reativo encontra-se na subunidade maior. Sugere-se que, em situações fisiológicas, as subunidades de CTI purificadas de sementes de Copaíba encontrem-se dimerizadas por interações fracas, facilmente desfeitas em certas condições de pH, temperatura e interação com proteases, o que poderia ter representado a atividade inibitória para tripsina na subunidade menor.

Existem vários métodos para se determinar a atividade de inibição de proteases. O método mais conhecido é o ensaio padrão baseado na medida do decréscimo da atividade enzimática induzida pela adição de quantidades crescentes de inibidor, juntamente com uma solução padrão de enzima em presença de seu substrato específico. A atividade residual da enzima é plotada em função das quantidades de amostras adicionadas, resultando numa curva de inibição. Desta curva é possível obter a quantidade de enzima inibida por uma determinada concentração de um inibidor (Belitz & Weder, 1990).

CTI de *C. langsdorffii* atuou sobre a tripsina e não foi ativo contra quimotripsina bovina Silva et al. (2001). Sua constante de inibição (**Figura 01**) apresentou ordem de grandeza de 10^9 M. Quando CTI foi submetido à purificação em coluna de fase reversa C18, observou-se constante de inibição de 1.06×10^{-6} M para CTI-I, indicando que a purificação em coluna C18 pode desestabilizar o *loop* reativo, diminuindo a afinidade do inibidor pela tripsina. Quando comparado a outros inibidores purificados de sementes, o valor de K_i está numa faixa intermediária entre os inibidores da família Bowman-Birk (10^{-7} a 10^{-8} M) e os inibidores do tipo Kunitz (10^{-11} M) (Campos et al., 1997).

A análise do pico correspondente ao complexo inibidor CTI – enzima tanto em gel filtração quanto em gel de SDS (**Figura 02**) tem acusado massa molecular de 30-34 kDa, não sendo observado o complexo de 40-44 kDa como era de se esperar para o clássico inibidor de Kunitz, sugerindo que o inibidor CTI ao formar o complexo com a enzima tripsina, libera a subunidade CTI-II.

O alinhamento entre os *loops* reativos dos membros da família Kunitz (**Figura 03**), permite verificar que CTI apresenta a conformação canônica para o *loop* reativo e todos os

resíduos são perfeitamente superpostos, assim como para STI (Song & Suh, 1998), ETI (Onesti et al., 1990) e WCI (Ravichandran et al., 1999). WBA (Mccoy & Kortt, 1997) apresenta uma inserção de 4 resíduos no *loop* reativo entre as posições P2 e P1 que torna o *loop* mais protuberante e, como resultado, não mostra qualquer atividade inibitória.

BASI tem a inserção de resíduos, um entre P4 e P3, um entre P3 e P2 e um entre P1 e P1' e, conseqüentemente, o seu *loop* reativo também diverge dos outros membros da família. Embora estruturalmente BASI pertença à STI Kunitz, o seu *loop* não possui a conformação canônica característica encontrada para os inibidores e sua atividade inibitória é bem diferente, uma vez que BASI pode inibir simultaneamente α -amilase e serinoprotease da família da subtilisina (Vallee et al., 1998).

CTI apresenta uma conformação canônica para o *loop* reativo com significativa atividade inibitória contra tripsina. Com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de interação inibidor-protease, a estrutura de CTI foi comparada com as estruturas de STI livre e complexado com tripsina porcina. O primeiro aspecto que chama a atenção é que nos inibidores não complexados, o *loop* reativo apresenta uma estrutura secundária muito bem definida (veja a seta na **Figura 04**). Já no caso do complexo CTI-Tripsina, as interações entre os sítios reativo do inibidor e ativo da tripsina resultam numa mudança drástica da conformação formando uma fita- β no *loop* reativo de STI que parecia com outra fita- β da tripsina formando uma folha- β .

A formação da folha- β indica um ganho na estabilidade estrutural que implica num gasto energético, mostrando que a formação do complexo é um evento favorável. As interações de STI com tripsina quando o complexo é formado não se restringem apenas aos sítios reativos. É formada uma interface de contato entre inibidor-enzima, que envolve várias partes de ambas as moléculas. A superposição da estrutura de CTI sobre a estrutura de STI complexado mostra que a maioria dos contatos inibidor-tripsina são preservados no suposto complexo entre CTI-Tripsina.

É evidente que na formação do complexo CTI-Tripsina, alguns dos resíduos do inibidor, particularmente Arg 64 na posição P1, sofrerão mudanças conformacionais para que haja uma melhor acomodação das interações. Por isso, são observados alguns contatos estericamente impedidos, por serem muito próximos, e outros em que os resíduos estão muito distantes para que haja uma interação específica. Seria necessário analisar a estrutura real do complexo CTI-Tripsina para se ter certeza definitiva da superfície de contato entre eles, mas as suposições inferidas aqui não devem ser muito diferentes dos contatos reais. O complexo foi preparado e, apesar das inúmeras tentativas de cristalização desse complexo, nenhum resultado promissor foi alcançado até o momento.

As razões estruturais para a alta atividade inibitória de CTI contra tripsina residem no fato de que a conformação canônica do *loop* reativo foi mantida evolutivamente, a despeito da presença de duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas e da falta de uma das pontes dissulfeto características da família STI Kunitz. Apesar das diferenças estruturais, a densa rede de pontes de hidrogênio, observada em CTI, mantém a integridade e a estabilidade estrutural da molécula.

O sítio reativo na maioria dos representantes da família Kunitz localiza-se na posição homóloga à do clássico inibidor de soja, apresentando resíduos básicos na posição P1 (Arg⁶³ – Ile⁶⁴). Em geral, este sítio é a região da molécula que define a sua especificidade e encontra-se em uma alça estabilizada por uma ponte dissulfeto e por um conjunto de interações fracas do tipo ponte de hidrogênio, conferindo ao inibidor uma conformação apropriada para a sua melhor interação com a enzima alvo.

Entretanto, os inibidores isolados recentemente da subfamília Caesalpinioideae têm evidenciado resíduos de aminoácidos diferentes daqueles observados para o SBTI. Pando et al. (2001) demonstraram a presença de ácido glutâmico e serina para o inibidor de *Delonix regia*, enquanto, Cavalcanti et al. (2002) identificaram resíduos de glutamina na posição da Arg⁶³. O inibidor de *Acacia confusa* da subfamília Mimosoideae mostrou-se diferente por apresentar os resíduos de Arg⁶⁴– Ile⁶⁵ no seu sítio reativo (Wu & Lin, 1993). Essas diferenças nos resíduos de aminoácidos corroboram para o melhor entendimento do mecanismo e força de interação entre estas moléculas e as proteases.

As informações sobre a identidade dos resíduos de aminoácidos que podem ser essenciais para a atividade do Inibidor CTI de sementes de copaíba foram obtidas através do uso de compostos que reagem especificamente com algum grupo particular de aminoácido funcional, na concentração de 10 mM final (Bulone et al., 1999).

O espectro de fluorescência acompanhando os resíduos de triptofano na estrutura da proteína, tem sido excelente técnica para monitorar sensíveis mudanças conformacionais, bem como, o envolvimento destes resíduos na manutenção da estabilidade estrutural e conformacional das proteínas. No caso onde os resíduos de Trp fazem parte do sítio de ligação, esta técnica é amplamente utilizada para estudar o envolvimento e mudanças conformacionais resultante da interação com o ligante. O espectro de emissão foi determinado após o período de pré-incubação com os modificadores (Figura 05). Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, observou-se uma alteração da intensidade de fluorescência em função de alguns modificadores e um concomitante

deslocamento do pico de emissão para o vermelho (330 para aproximadamente 370 nm) na presença de PGO, para os demais modificadores este deslocamento foi menos significativo.

Grupos tióis livres de cisteínas ou oxidados na forma de cistinas são importantes na estabilização da estrutura conformacional e funcional de diversas proteínas. Entretanto, o inibidor CTI mostrou uma resistência funcional em relação a ação de agentes redutores seguidos de alquilação, apesar da significativa alteração estrutural observada pelas diversas técnicas utilizadas para caracterizar o inibidor em questão (espectrometria de massas MALDI-TOF, fluorescência e dicroísmo circular).

O modificador fenilgloxal (PGO), que reage especificamente com resíduos de Arg, apresentou maior inibição da atividade de CTI. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC) mostrou-se o segundo inibidor mais potente da atividade do inibidor CTI, indicando que grupos carboxilas dos resíduos de Glu ou Asp são importantes para a atividade inibitória. Resumidamente, estes resultados mostraram que grupos carboxilas e resíduos de arginina são de fundamental importância para a atividade inibitória, embora, o envolvimento de resíduos de triptofano não deve ser excluído.

Nenhum decréscimo da absorvância próximo a 278 nm foi observado, sugerindo que os resíduos de tirosina não foram modificados por DEPC. Resíduos de Cys, Lys e Arg são modificados também por DEPC, o que pode ter contribuído para a perda da atividade, fato confirmado pela inativação de CTI por PGO e pouca inativação por outros reagentes específicos para Cys e Lys, sugerindo que a inibição ocorre de forma não específica com resíduos de aminoácidos que não estejam localizados no sítio reativo.

Inibição significativa foi obtida na presença de EDC, sugerindo que a Glu e Asp podem estar envolvidos na atividade inibitória de CTI. O espectro de emissão de CTI na ausência bem como na presença de reagentes modificadores não foi afetado significativamente por EDC, embora tenha ocorrido a baixa da atividade inibitória de CTI nas concentrações de EDC utilizadas nos experimento de medidas de fluorescência. Estudos prévios mostraram a importância de resíduos de arginina para a atividade inibitória dos inibidores do tipo Kunitz e que o bloqueio destes grupos com modificadores específicos favoreciam intensamente a perda da atividade, mostrando que estes grupos são importantes para a reação de inibição da tripsina. A inibição da atividade de CTI em, aproximadamente, 80 % pelo PGO confirma que resíduo de arginina localizado na posição PI, como pode foi comprovado pelos estudos de estrutura primária e estrutura tridimensional, é fundamental para a atividade inibitória de CTI.

05. ESTABILIDADE FUNCIONAL E CONFORMACIONAL DO INIBIDOR (CTI)

Estudos da estabilidade conformacional (*unfolding e refolding*) fornecem importantes informações sobre a biogênese e o enovelamento estrutural das proteínas. A seguir estão descritos os resultados e a discussão dos efeitos de agentes físico-químicos (pH, temperatura, DTT, uréia e cloreto de guanidina) na estabilidade conformacional do inibidor de tripsina (CTI) purificado de sementes de *Copaifera langsdorffii*.

DICROÍSMO CIRCULAR DO INIBIDOR CTI

A concentração de CTI nos experimentos correspondeu a 10 μM por apresentar boa relação sinal/ruído. O espectro do inibidor CTI (**Figura 01**) revelou que esta proteína possui uma estrutura secundária com baixa porcentagem de α -hélice, 39 % de folha β -pregueada, 23,5 % de estrutura turn e 26 % de conformação aleatória, resultados semelhantes àqueles obtidos para o STI purificado por Kunitz (1947).

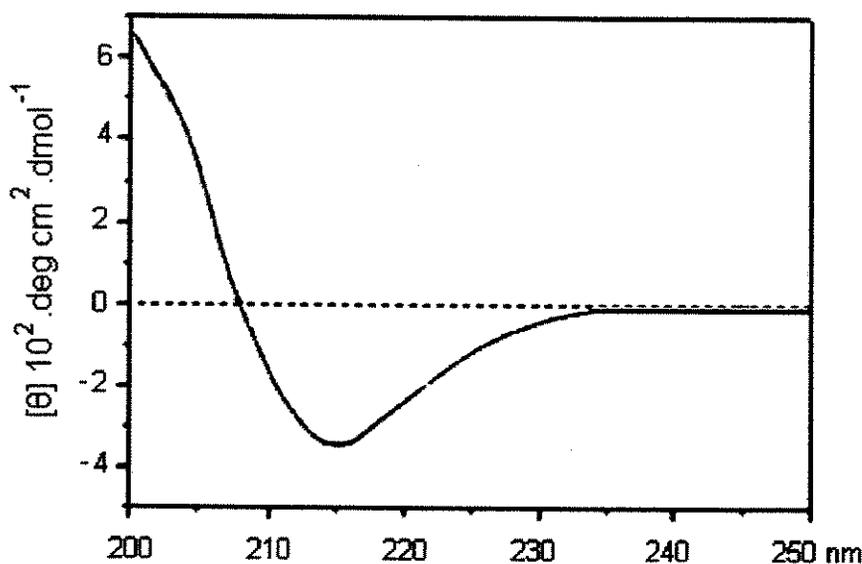


Figura 01 – Dicroísmo circular de CTI. Espectro obtido na concentração de 10 μM de CTI, informando porcentagem de estrutura secundária da proteína em tampão fosfato de potássio 1 mM pH 7.0.

EFEITO DO DITHIOTHREITOL (DTT)

CTI não tratado com DTT (nativo) foi eluído da cromatografia de gel filtração com tempo de retenção muito próximo ao da tripsina que tem massa molecular de 24 kDa. O perfil de eluição de CTI tratado com redutor DTT (oxidado) permite observar um único pico de proteína com atividade inibitória (**Figura 02**). Quando reduzido com DTT na concentração final de 1 mM, CTI passa a ter um tempo de retenção igual a 30,979 minutos, próximo ao pico observado para a aprotinina, indicando subunidades de baixa massa molecular.

O tratamento com diferentes concentrações finais de DTT (1, 10 e 100 mM), não influenciou significativamente na atividade do inibidor CTI como evidenciado na **Figura 03A**. A dosagem da atividade inibitória foi determinada na presença de DTT antes da diálise, não se observando a influência do DTT. As possíveis alterações estruturais ocasionadas pela ação do DTT nas concentrações de 1, 10 e 100 M foram acompanhadas em gel de poliacrilamida Tricina a 16,5 % (**Figura 03B**).

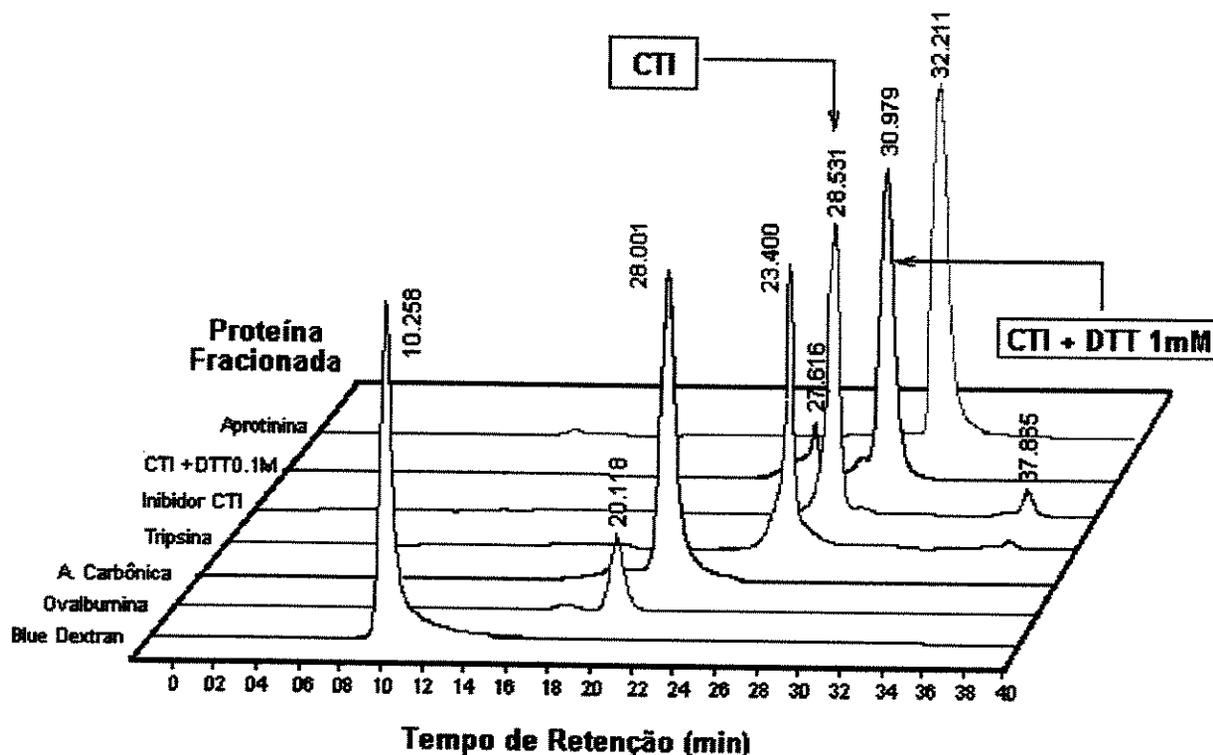


Figura 02 - Perfil de eluição de CTI nativo e oxidado com DTT 1 mM em coluna SW-300 HPLC. Foi aplicado 0,3 mg de CTI nativo e 0,3 mg de CTI reduzido com DTT 1 mM. Foram utilizados marcadores do perfil de eluição: Blue Dextran (200.000 kDa); Ovalbumina (44 kDa); Anidrase Carbônica (29 kDa), Tripsina (24 kDa) e Aprotinina (6.5 kDa).

Este gel por apresentar malhas mais fechadas, permitiu uma melhor identificação das interações das subunidades de CTI, que não foram diferenciadas em gel de poli-acrilamida 12,5 %. Na pista eletroforética 1 tem-se marcadores de peso molecular: Fosforilase (94 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina (20 kDa) e Lisozima (14 kDa). A fração CTI oxidada e as tratadas com 1, 10 e 100 mM de DTT foram aplicadas nas pistas eletroforéticas 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Nota-se a presença de três bandas (20, 11 e 9 kDa) para CTI nativo e duas independentemente do tratamento de redução, com massa molecular aparente de aproximadamente 11 e 9 kDa.

O espectro da intensidade de fluorescência em função da emissão (nm) antes e após a redução de CTI com diferentes concentrações de DTT (**Figura 03C**) evidencia a ausência de deslocamento do pico de intensidade máxima para o vermelho, contudo observa-se uma diminuição da intensidade máxima de fluorescência.

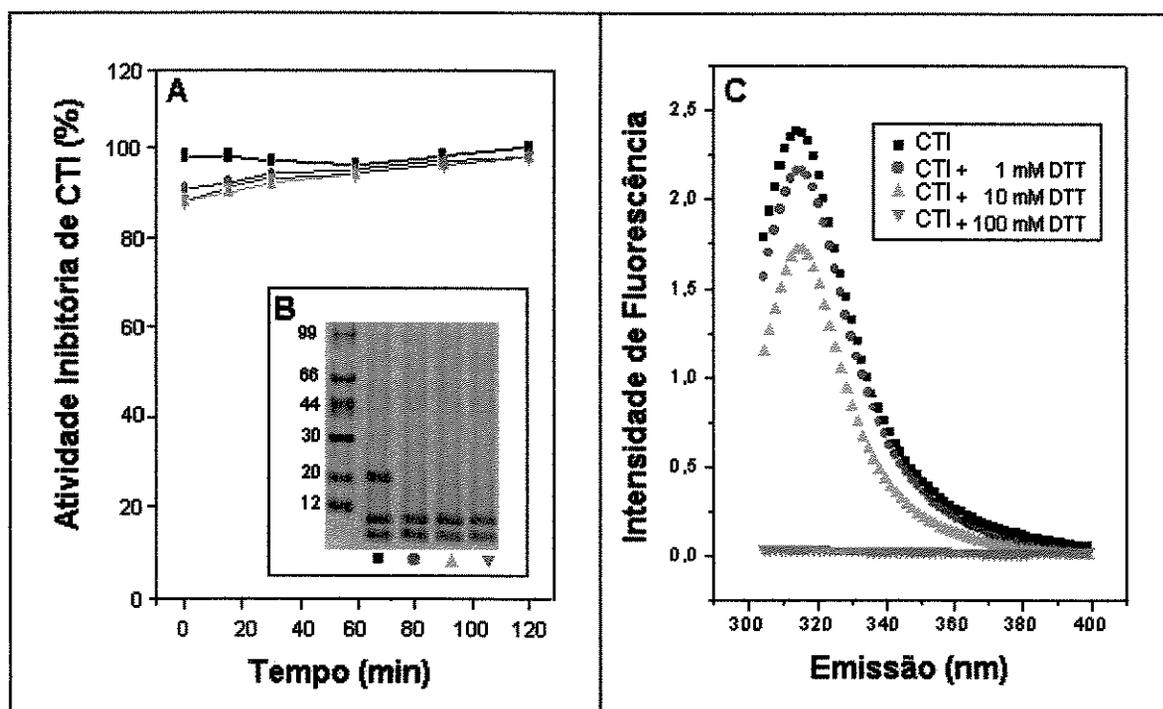


Figura 03 - A) Efeito do DTT na atividade de CTI. A atividade inibitória (%) foi determinada em diferentes concentrações finais de DTT, por intervalo de tempos específicos e posteriormente dialisado contra tampão Tris-HCl por 2 horas. **B)** SDS-PAGE Tricina de CTI oxidado e reduzido com DTT: preto 0M de DTT; vermelho 1mM; verde 10 mM; azul 100 mM de DTT. **C)** Medidas de fluorescência de CTI oxidado e reduzido com diferentes concentrações de DTT.

Na **Figura 04** observou-se mudança no espectro de CD do inibidor CTI após a adição de DTT. O espectro de CD suporta mudanças estruturais que não haviam sido observadas por medidas de fluorescência. A análise dos espectros de CD permite inferir a ocorrência de alterações estruturais na molécula do inibidor CTI. Assim, para a ação redutora do DTT na molécula de CTI, observa-se um decréscimo do pico negativo próximo a 200 nm, correspondendo à diminuição das estruturas secundárias do tipo α -hélice e um aumento das estruturas do tipo β -pregueada.

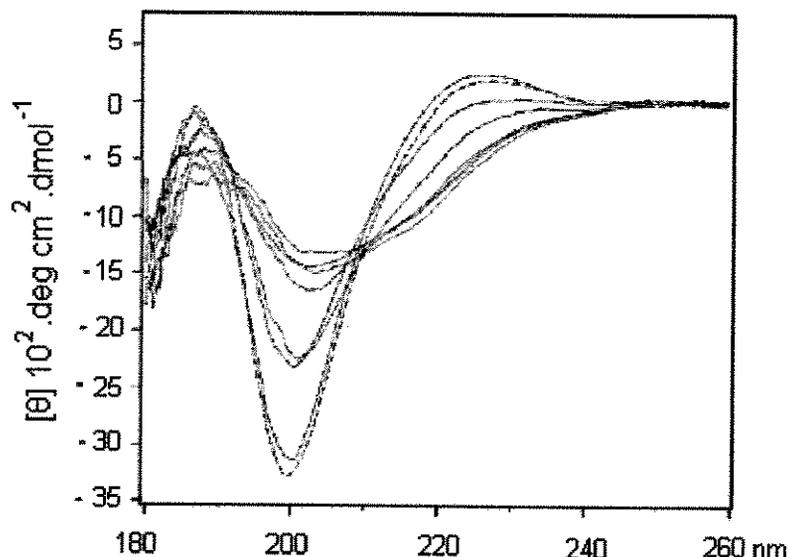


Figura 04 - Espectro de Dicroísmo Circular em diferentes pontos durante a redução do inibidor CTI. A linha tracejada corresponde ao espectro antes da adição de DTT. As linhas sólidas representam o espectro coletado em vários pontos após a adição de DTT 30, 60, 120, 240, 300 e 330 min.

EFEITO DO pH EM TEMPERATURAS DISTINTAS

A estabilidade de CTI em diferentes condições de pH e temperaturas foi estudada como evidenciado na **Figura 05**. CTI mostrou-se estável em uma ampla faixa de pH, sendo um pouco menos estável a valores extremos de pH. Observou-se uma perda da atividade inibitória de aproximadamente 50 % em pH 10. A atividade inibitória diminuiu gradativamente a partir de 60 °C, principalmente em valores de meio alcalino, mas esta atividade pode ser regenerada após 24 horas a 37 °C (dado não mostrado).

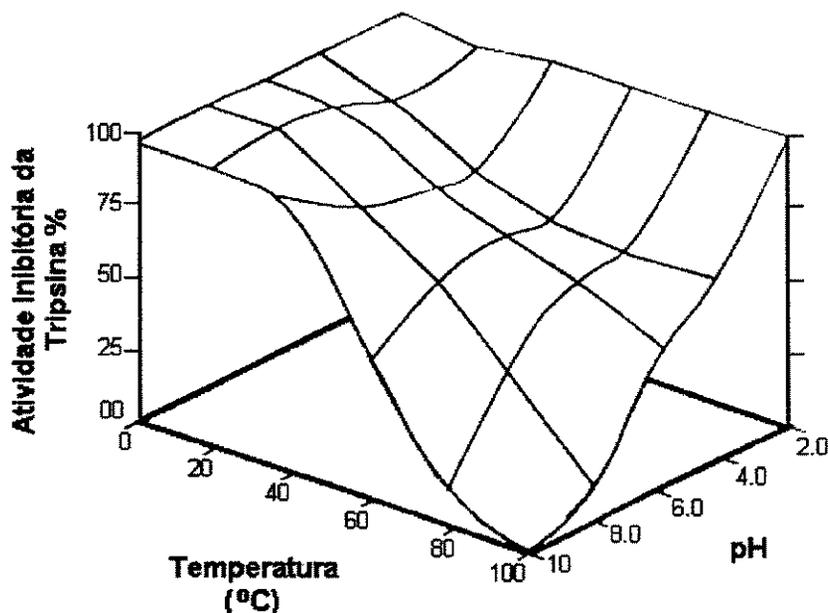


Figura 05 - Efeito do pH em temperaturas distintas na estabilidade funcional de CTI.

EFEITO DE AGENTES CAOTRÓPICOS - URÉIA

Alterações estruturais em CTI - desnaturação

Inicialmente, determinou-se o tempo necessário para a completa desnaturação do inibidor CTI pela uréia. O espectro de emissão foi determinado após diversos intervalos de tempo até 24 horas. Verificou-se que a desnaturação foi completada após 24 horas (não mostrado). A desnaturação de CTI pela ação da uréia foi um processo reversível por diálise, imediatamente após o equilíbrio da solução, permitindo a continuidade dos experimentos.

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, observou-se alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração de uréia e um concomitante deslocamento dos picos de emissão em direção ao vermelho (Figura 06). Plotando os valores de comprimento de onda de emissão máximo em função da concentração de uréia (Figura 07), foi obtida uma curva de desnaturação simples, indicando que o mecanismo de desnaturação por uréia do inibidor CTI envolve pelo menos dois estágios. Esta observação é reforçada pelo deslocamento do centro de massa (Figura 07 e interno). Ambos os resultados demonstram que a desnaturação do inibidor

inicia-se em concentrações acima de 0.5 M de uréia. Uma observação interessante é que a inclinação da reta na fase de transição é muito mais acentuada quando se monitorou o comprimento máximo de absorção (λ_{max}) do que o centro de massa (Figura 07 e interno).

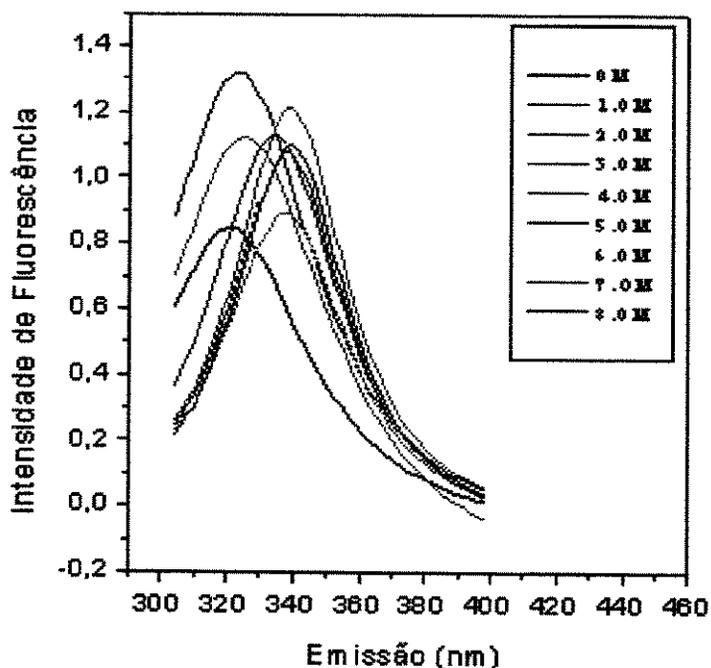


Figura 06 – Espectro de emissão de fluorescência de CTI desnaturada com uréia. As amostras em concentração de $10\mu\text{g}/\text{mL}$ foram excitadas a 293nm .

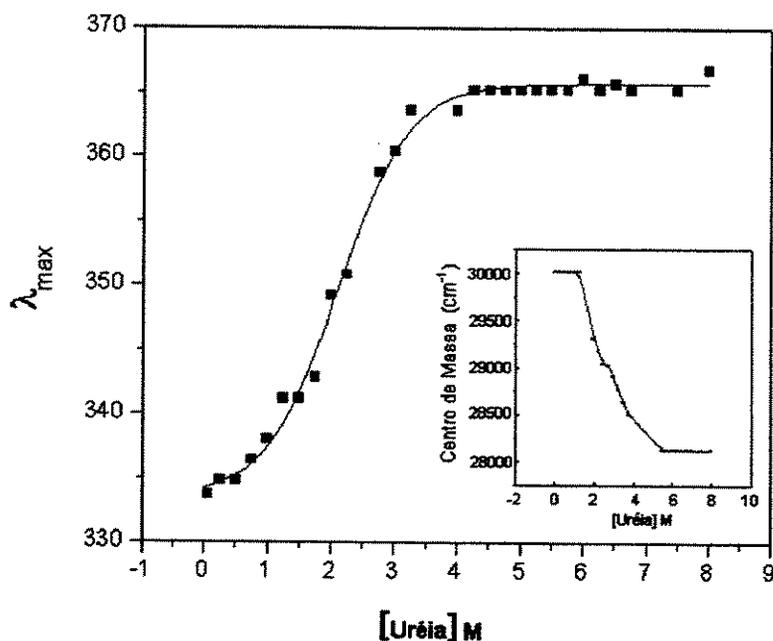


Figura 07 - Desnaturalização do inibidor CTI de copaíba por uréia. Efeito da uréia no centro de massa do inibidor (interno).

Através dos valores de máximo comprimento de onda de emissão, foi possível fazer o cálculo descrito em métodos, da fração desnaturada de proteína para cada concentração de uréia (**Figura 08**). Os dados apresentados evidenciam que a desnaturação por uréia ocorre de maneira gradual, sendo visivelmente completa na máxima concentração de uréia (8 M) após a redução de CTI com DTT 1 mM. O gráfico interno mostra a variação de energia livre de desnaturação em função da concentração de uréia.

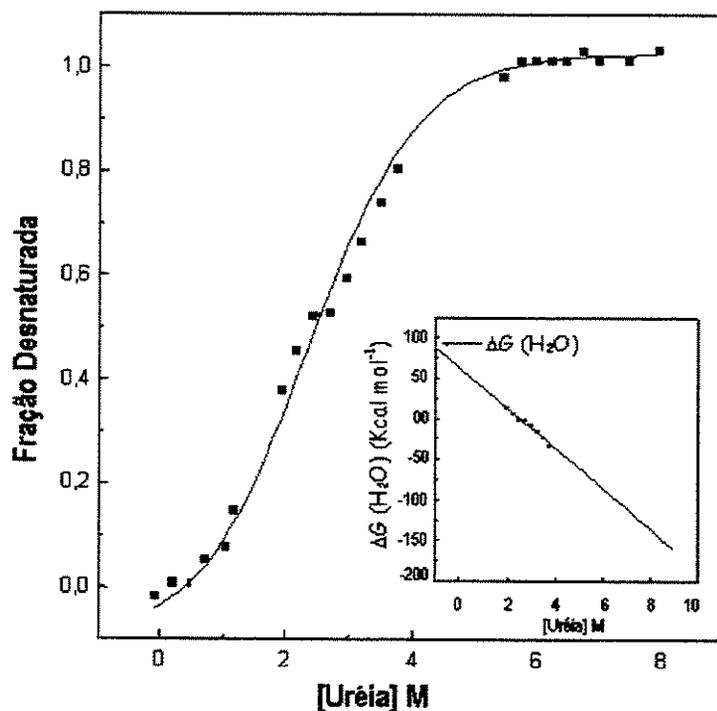


Figura 08 - Desnaturação do inibidor CTI em presença de uréia (curva maior). O gráfico interno evidencia a dependência da variação de energia livre ΔG (H_2O) de desnaturação em função da concentração de uréia.

Alterações estruturais em CTI - renaturação

Na **Figura 09**, notam-se alterações conformacionais da renaturação por diálise do inibidor CTI na presença de 8 M de uréia. Observa-se uma reversibilidade em termos estruturais do inibidor incubado com uréia 8 M após a diálise por 15 e 30 minutos. O gráfico da intensidade de fluorescência, em função do comprimento de onda de emissão evidencia alteração da intensidade de fluorescência em função dos tempos de diálise, para o inibidor tratado com 8 M de uréia, obtendo-se um deslocamento reverso dos picos de emissão da região de 341,2 nm para aproximadamente 322 nm.

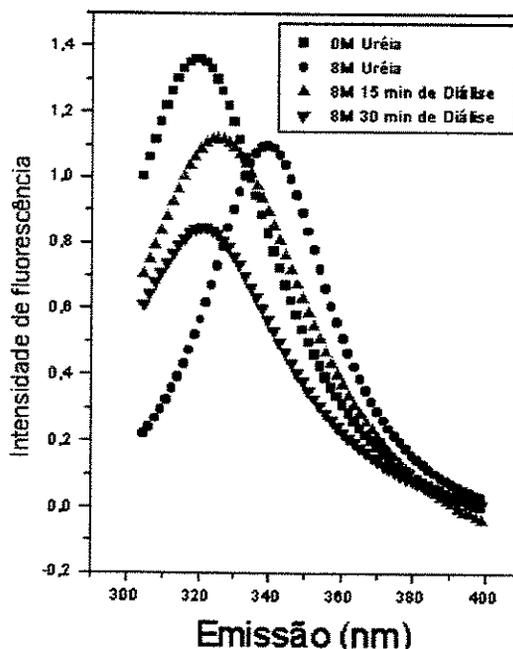


Figura 09 – Efeito da diálise no espectro de emissão de fluorescência de CTI com uréia. As amostras CTI, CTI tratado com 8 M de uréia e CTI tratado com 8 M de uréia dialisado por 15 e 30 minutos, em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram excitadas a 293 nm.

Alterações funcionais de CTI

Na **Figura 10** tem-se o gráfico da atividade inibitória de CTI em função da concentração de uréia. É interessante notar que, a perda de atividade inibitória sobre a enzima tripsina aumenta com o acréscimo da concentração de uréia, sendo praticamente nula na concentração de 5 M. Na concentração de 4 M a atividade inibitória é praticamente abolida (2 %).

CTI, aparentemente, é muito resistente ao agente desnaturante utilizado (uréia), apresentando aproximadamente 50 % de atividade inibitória na presença de uréia 3,25 M. A atividade inibitória foi completamente ausente, quando CTI (reduzido com DTT 1 mM) foi incubado com uréia 8 M por 24 horas e sua atividade não foi recuperada após as diluições de 1:100 ou 1:1000 do agente desnaturante (dados não mostrados). A perda total da atividade de CTI reduzido com DTT 1 mM, ocasionada pela desnaturação do agente caotrópico uréia 8 M por 24 horas, mostrou-se proporcionalmente reversível em relação ao tempo de diálise (**Figura 11**), recuperando aproximadamente 60 % da atividade inibitória sobre a enzima tripsina após 6 horas de diálise.

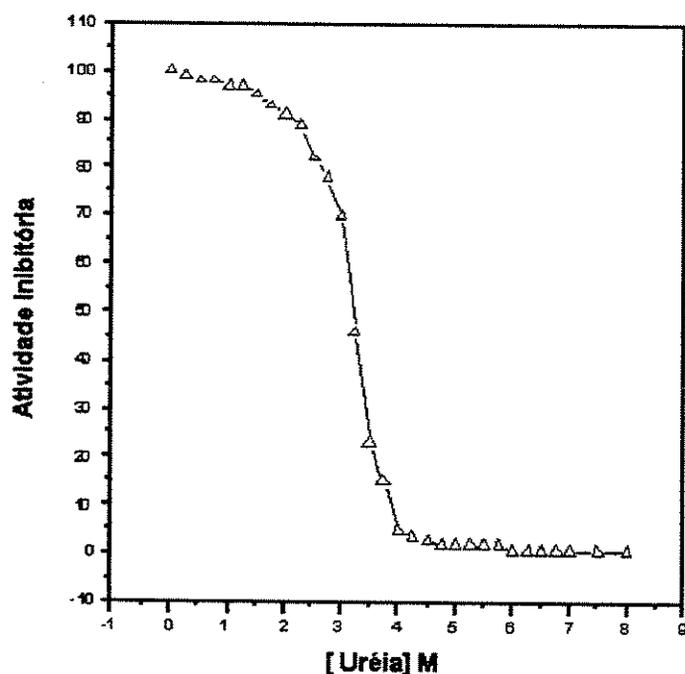


Figura 10 - Efeito da variação da concentração de uréia na atividade inibitória de CTI. A atividade inibitória foi determinada como descrito em métodos.

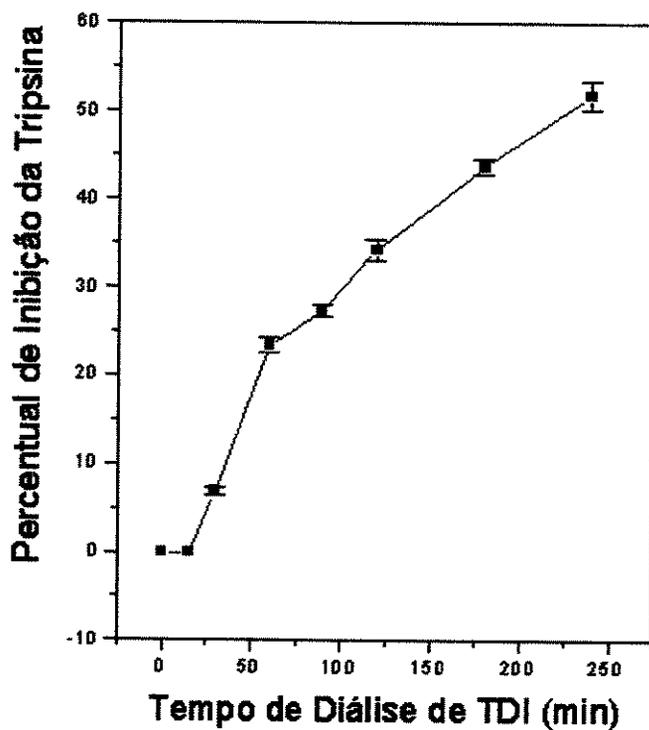


Figura 11 - Reversibilidade da atividade funcional do inibidor de copaíba (CTI) após a desnaturação por uréia. O gráfico em linha demonstra a reversibilidade através da diálise em função do tempo.

EFEITO DE AGENTES CAOTRÓPICOS - CLORETO DE GUANIDINA

Alterações Estruturais em CTI - Desnaturação

Da mesma forma que com a uréia, inicialmente procurou-se determinar o tempo necessário para a completa desnaturação do inibidor pelo cloreto de guanidina. O espectro de emissão foi determinado em diversos intervalos de tempo, até 42 horas. Assim, foi verificado que a desnaturação se completou após 13 horas (não mostrado).

Através do gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, observou-se o mesmo efeito que ocorreu com a desnaturação por uréia, ou seja, uma alteração da intensidade de fluorescência em função da concentração do cloreto de guanidina e um concomitante deslocamento dos picos de emissão para o vermelho de 322 para 340 nm (**Figura 12**).

Observa-se ainda na **Figura 12** um rápido deslocamento para o vermelho e uma diminuição da intensidade de fluorescência a partir da concentração de 0.2 M de cloreto de guanidina. Plotando-se os valores de comprimento de onda de emissão máximo em função da concentração de cloreto de guanidina (**Figura 13**), observa-se uma curva de desnaturação simples, sugerindo que o mecanismo de desnaturação do inibidor por tal reagente caotrópico, também envolve pelo menos dois estágios. Essa observação é reforçada pelo deslocamento do centro de massa (**Figura 13 interno**). Os resultados demonstram que em concentrações acima de 0.2 M de cloreto de guanidina o processo de desnaturação se inicia.

Através dos valores de máximo comprimento de onda de emissão, foi possível fazer o cálculo, descrito em métodos, da fração desnaturada de proteína em função da concentração de GdnHCl (**Figura 14**). Os dados apresentados evidenciam que a desnaturação por cloreto de guanidina se dá de maneira brusca em baixas concentrações do agente caotrópicos. O gráfico interno mostra a variação de energia livre de desnaturação em função da concentração de GdnHCl.

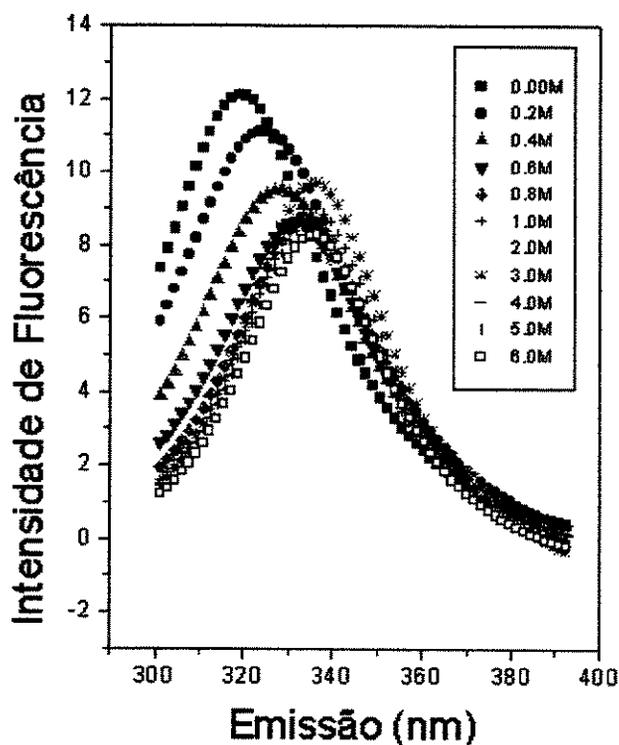


Figura 12 – Espectro de emissão fluorescência de CTI desnaturado com cloreto de guanidina.

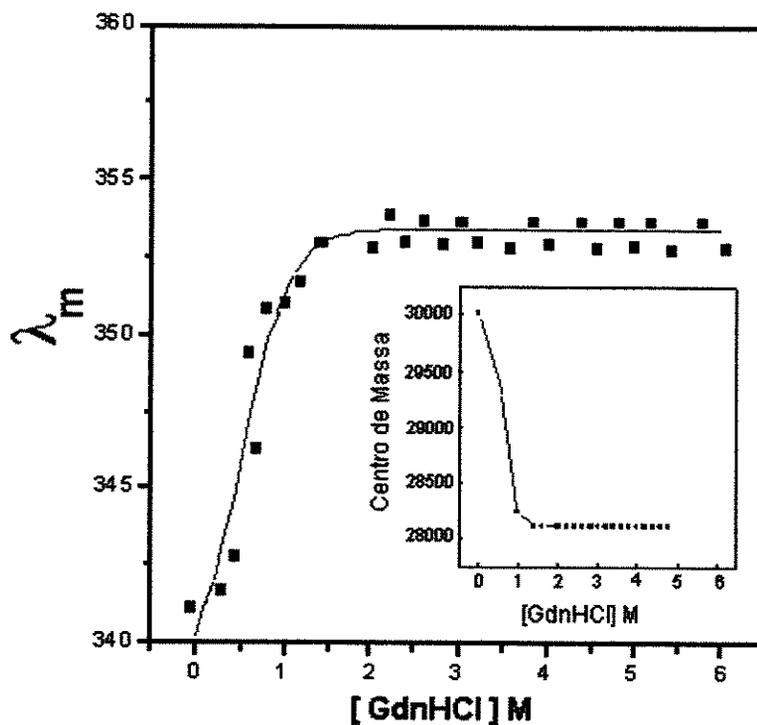


Figura 13 - Desnaturação do inibidor CTI por cloreto de guanidina. Efeito do cloreto de guanidina no centro de massa do inibidor (interno).

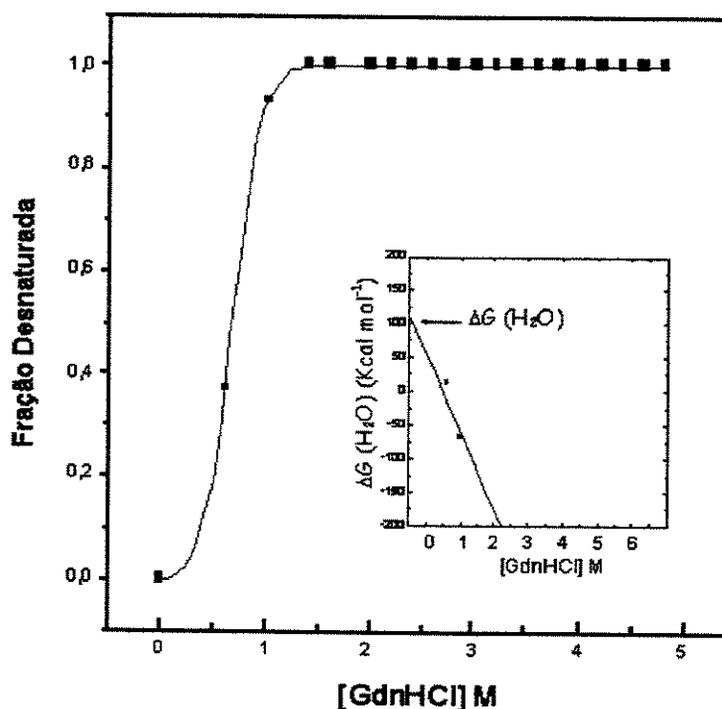


Figura 14 - Efeito do cloreto de guanidina na fração desnaturada do inibidor. Determinação da variação de energia livre na ausência do agente desnaturante, $\Delta G (H_2O)$ (interno).

Alterações Estruturais em CTI - Renaturação

O gráfico da **Figura 15** evidenciou que CTI, quando incubado em 6 M de cloreto de guanidina, perde completamente sua estrutura conformacional, como era de esperar. Os processos de diálise por 15 e 30 minutos não são suficientes para regenerar a conformação próxima à nativa deste inibidor. No entanto, a diálise após 6 horas permite visualizar um retorno à conformação de CTI, diminuindo a intensidade de fluorescência.

O gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão evidenciou alteração da intensidade de fluorescência em função dos tempos de diálise para CTI tratado com 6 M de cloreto de guanidina, obtendo-se também um deslocamento reverso dos picos de emissão da região do vermelho para aproximadamente 320 nm.

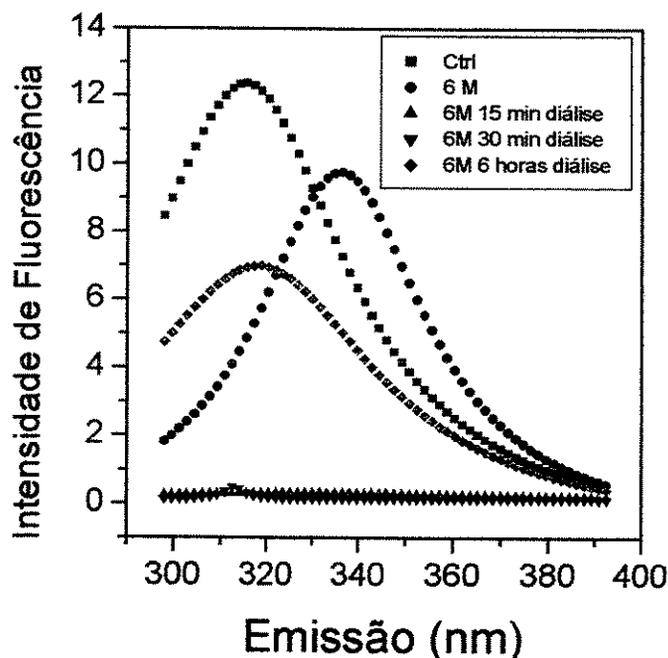


Figura 15 – Espectro de emissão de fluorescência de CTI desnaturada por cloreto de guanidina. As amostras CTI, CTI tratado com 6 M de GdnHCl e CTI tratado com 6 M de GdnHCl dialisado por 15, 30 minutos e 6 horas, em concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram excitadas a 293 nm.

Alterações Funcionais de CTI

Na **Figura 16** tem-se o gráfico da atividade de CTI em função da concentração de cloreto de guanidina. A perda da atividade inibitória aumenta em função da concentração de cloreto de guanidina, ocorrendo de forma brusca em baixas concentrações do agente desnaturante.

CTI perdeu completamente sua atividade inibitória na presença de 6 M de cloreto de guanidina, contudo, a molécula de CTI desnaturada mostrou-se reversível no aspecto funcional inibindo a atividade da serinoprotease tripsina, quando a guanidina foi gradativamente retirada por diálise. Novamente, a atividade inibitória de CTI não foi detectada após a diluição do cloreto de guanidina (1:100 e 1:1000). A **Figura 17** evidencia que CTI, mesmo após 6 horas (360 minutos), recupera sua atividade pós-diálise em apenas aproximadamente 40 %, sendo mais rápida no início da diálise, ou seja, o processo de enovelamento da proteína não ocorreu de forma proporcional ao tempo de diálise.

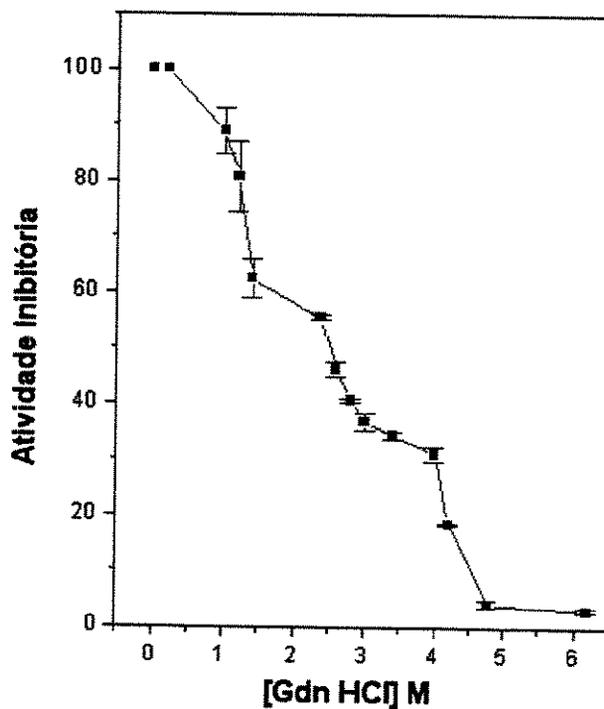


Figura 16 - Efeito do cloreto de guanidina na atividade inibitória de CTI, determinado de acordo com descrito em métodos.

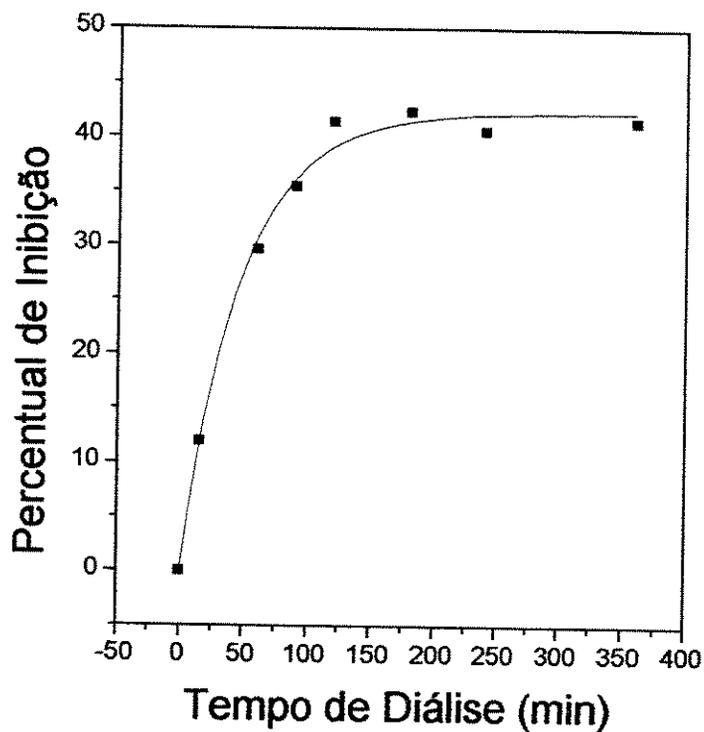


Figura 17 - Reversibilidade da atividade funcional de CTI após a desnaturação por Cloreto de guanidina.

DISCUSSÃO

O espectro de CD no distante-UV, para uma proteína qualquer, é sensível à conformação de cadeia principal. A região informativa está entre 170 e 240 nm, onde o grupamento amida peptídico tem múltiplas faixas de absorção superpostas. Medidas de polipeptídios sintéticos e de proteínas com estrutura já conhecida definiram os espectros de CD de α -hélices, estrutura β -pregueada e estrutura de conformação aleatória (Woody, 1995; Kelly & Price, 1997). A concentração de CTI nos experimentos correspondeu a 10 μ M por apresentar boa relação sinal/ruído.

A porcentagem de estrutura secundária, em tampão fosfato, foi calculada de acordo com Gans et al. (1991), atingindo aproximadamente 90 %, do valor semelhante ao predito teoricamente para os inibidores do tipo Kunitz (STI) de soja. O espectro do inibidor CTI (**Figura 01**) revelou que esta proteína possui uma estrutura secundária com 1,5 % de α -hélices, 39 % de folha β -pregueada, 23,5 % de estrutura turn e 26 % de conformação aleatória, resultados semelhantes àqueles obtidos para o STI purificado por Kunitz (1947).

Estimativas do conteúdo em α -hélices de proteínas, deduzidas do espectro de CD, concordam com os valores obtidos de estudos cristalográficos por raios X. Entretanto, nem sempre o conteúdo de estrutura β pode ser avaliado através de espectros de CD. A incerteza é maior porque as estruturas β são menos regulares do que as α -hélices e contribuem menos para o espectro de CD (Greenfield & Fasman, 1969).

Para proteínas com pequeno conteúdo de α -hélice, picos positivos em torno de 220 nm são primariamente devido à presença de estrutura beta pregueada na proteína. Assim, o aumento do pico negativo próximo a 220 nm também suporta um aumento da conformação beta pregueada observado quando o inibidor CTI é reduzido com DTT. Desta forma, as mudanças observadas no espectro de dicroísmo circular são consistentes com uma baixa hidratação, aumentando as interações hidrofóbicas quando o CTI é completamente reduzido e desenovelado.

As proteínas são multifuncionais no sentido de que sua seqüência específica de aminoácidos determina simultaneamente seu enovelamento, sua função e sua degradação. A equivalência entre a rigidez (estabilidade) e a flexibilidade (função) das proteínas resulta da

baixa energia livre de estabilização ($\Delta G^{\circ} N \rightarrow U$), derivadas da diferença mínima entre as forças atrativas e repulsivas (Jaenicke, 1999).

A estabilidade das proteínas é resultante de fracas interações atrativas ou repulsivas, que são dependentes das condições fisiológicas designadas por um estado padrão. Como a energia de estabilização $\Delta G^{\circ} N \rightarrow U$ (com N e U indicando o estado nativo e o desenovelado, respectivamente) é dependente de condições padrões, variações na temperatura, pH e agentes caotrópicos podem ser aplicados para acompanhar processos de desenovelamento e enovelamento, utilizando propriedades espectrais e funcionais (Jaenicke, 1999).

O CTI é um novo inibidor da subfamília Caesalpinoideae da família das leguminosas, constituído por duas subunidades (CTI-I e CTI-II) considerados por Silva et al. (2001) como inibidores distintos. Ambos fariam parte de uma mesma proteína, mas com a ausência das interações covalentes (pontes dissulfeto), que estabilizam a cadeia maior com a menor no caso dos inibidores de Kunitz, observados para as espécies da subfamília Mimosoideae.

Estas subunidades estariam estabilizadas por uma ampla rede ligações fracas (pontes de hidrogênio) entre as superfícies das duas subunidades, justificando a presença de 3 ou mais bandas em gel de eletroforese sob condições desnaturantes. A banda principal seria uma combinação das bandas de 11 e 9 kDa e as demais seriam agregações não específicas das diferentes subunidades. Diante da explanação desta importante molécula (CTI), procura-se nesta parte da tese descrever um pouco mais sobre as características da estabilidade conformacional e funcional de CTI, no que diz respeito à ação do pH, da temperatura, dos efeitos do agente redutor DTT e dos agentes caotrópicos (uréia e cloreto de guanidina).

A presença de pontes dissulfeto é de suma importância na projeção de resíduos críticos do sítio reativo dos inibidores que irão interagir com as proteases. O efeito de variadas concentrações de DTT (1, 10 e 100mM) na atividade inibitória de CTI foi avaliado por Silva et al., (2001). Diferente do observado por Ramasarma et al. (1995), com um típico inibidor de Bowman-Birk de *Dolichos biflorus*, que apresenta dois sítios reativos para proteases diferentes ligados entre si por pontes dissulfeto, CTI de *C. langsdorffii* não perdeu sua atividade antitriptica frente estas diferentes concentrações do redutor DTT (Figura 03A).

Posteriormente, apresenta-se uma discussão detalhada sobre a influência do agente redutor DTT na estrutura de CTI, através de gel de eletroforese SDS-Tricina, gel filtração em coluna Protein Pack SW-300 (HPLC), espectro de fluorescência e de dicroísmo circular

(Figura 02, 03 e 04). O Gel de eletroforese SDS-Tricina (Figura 03A), não detectou diferença estrutural para as distintas concentrações de DTT utilizado. Na ausência de DTT, observam-se 3 bandas protéicas (20, 11 e 9 kDa) para o inibidor CTI. A adição de baixas concentrações de DTT (1mM) foi suficiente para obter apenas duas bandas (11 e 9 kDa), sugerindo que o DTT promove uma desestabilização das subunidades de CTI, promovendo a desagregação das subunidades.

Um resultado muito semelhante foi também observado em cromatografia de gel filtração usando coluna Protein Pack SW-300 (Figura 02). Na ausência de DTT 1 mM, um único pico foi eluído aos 28.581 minutos, próximo ao tempo de eluição da tripsina, sugerindo uma massa molecular relativa de 24 kDa para o CTI organizado em duas subunidades. Na presença de DTT 0.1 mM um pico maior de proteína foi eluído a 30.979 minutos, um pouco antes do marcador Aprotinina, indicando a formação de dímeros constituídos por moléculas menores, que não são diferenciadas em dois picos devido à similaridade de massa (11 e 9 kDa) e características da coluna SW-300. A massa molecular aparentemente alta para CTI (24 kDa) em condições nativas é devido às associações das diferentes unidades monoméricas por interações fracas. Isto tem sido relatado tanto para inibidores de Bowman-Birk quanto para inibidores de Kuntz (Birk & Applebaum, 1985; Wu & Whitaker, 1990). Contudo, não se considerava a agregação de subunidades distintas como para CTI.

CTI mostrou-se uma proteína heterodimérica (dados confirmados pelo modelo tridimensional de CTI), sendo o dímero pouco estável, pois após a redução, a forma dimérica desaparece e as formas monoméricas são detectáveis e diferenciadas em gel de tricina, ou detectáveis em gel filtração a partir do tempo de eluição, resultados também observados o inibidor de *T. cearensis* de Tanaka et al. (1997).

O espectro de fluorescência acompanhando os resíduos de triptofano na estrutura da proteína, tem sido excelente técnica para monitorar sensíveis mudanças conformacionais, bem como, o envolvimento destes resíduos na manutenção da estabilidade estrutural e conformacional das proteínas. No caso onde os resíduos de Trp fazem parte do sítio de ligação, esta técnica é amplamente utilizada para estudar o envolvimento e mudanças conformacionais resultante da interação com o ligante.

Dois trabalhos detalhando a estabilidade conformacional dos inibidores têm demonstrado resultados interessantes. Grinberg et al. (2000) discutiram a desnaturação térmica e a contribuição das pontes de hidrogênio na estabilização do estado nativo de um

inibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI), encontrado em sementes de soja, utilizando o método de calorimetria diferencial de alta sensibilidade (HS-DSC do inglês: *high-sensitivity differential scanning calorimetry*). De Souza et al. (2000) observaram os efeitos de agentes desnaturantes na atividade inibitória e na estabilidade conformacional do inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizolobium parahyba*.

Ramasarma et al. (1995) observaram um deslocamento do pico de emissão de fluorescência máxima de 335 para 310 nm no caso do inibidor (HGPI) nativo e tratado com DTT 1 mM, respectivamente. Esse fato sugere que, a redução do inibidor com DTT 1 mM pode remover anormalmente a emissão de tirosina. Diferentemente, em CTI tratado com DTT (1, 10 e 100 mM) não foi observado nenhum deslocamento de pico, confirmando que a redução de CTI por DTT altera a estrutura quaternária (formação de heterodímeros) mas não a estrutura terciária conformacional. De um modo geral, os inibidores apresentam a tendência em se associar formando dímeros ou tetrâmeros que são ativos naturalmente (Birk & Applebaum, 1985). Contudo, ao contrário de outros inibidores anteriormente relatados, CTI parece ser ativo somente na sua forma monomérica, inibindo somente uma molécula de tripsina.

A diminuição da intensidade máxima de fluorescência que ocorre após adição crescente de DTT, pode ser explicada pelo envolvimento deste redutor como uma sonda “*quenching*” que estaria suprimindo a intensidade de fluorescência da amostra. Como observado na **Figura 3C**, o aumento na concentração de DTT é acompanhado por progressivo decréscimo da intensidade de fluorescência. Resultados similares foram observados para outros “*quenchers*”.

Sugere-se que a resistência de CTI aos agentes desnaturantes estaria relacionada à presença de pontes dissulfeto muito estáveis às concentrações de DTT utilizadas e que, somente uma redução e alquilação desta ponte ocasionaria a perda total da atividade antitriptica. Os resultados para CTI estão de acordo com aqueles observados por Lehle et al. (1996), onde o inibidor de *Erythrina caffra* (também da família Kunitz) retém sua atividade mesmo após a desnaturação suave de suas pontes dissulfeto. Através destes resultados, confirma-se que CTI é alterado estruturalmente com adições mínimas de DTT. Contudo, as alterações ocasionadas parecem compreender somente a estrutura quaternária de CTI, justificando a presença de atividade inibitória para o inibidor CTI.

A estabilidade de CTI a diferentes temperatura e condições de pH foi estudada como apresentado na **Figura 05**. CTI é notavelmente estável a uma ampla faixa de pH, no entanto, a atividade inibitória é consideravelmente prejudicada em valores de pH alcalino e em altas temperaturas. Em pH alcalino e temperaturas acima de 60 °C, CTI perde sua atividade em torno de 90 %, resultado também observado para os inibidores de Gruen et al. (1984). A alta estabilidade de CTI a condições ácidas está de acordo com o fato da maioria dos inibidores de tripsina serem eluídos de cromatografia de afinidades em pH ácido.

A alta estabilidade de CTI frente à variação de temperatura é uma característica observada para muitos inibidores, principalmente aqueles da família Bowman-Birk. Em valores de temperatura acima de 60 °C, a atividade inibitória começa a decair abruptamente, estabilizando a 40 % quando tratada a 80 e 100 °C por 60 minutos em pH 8.0. Valores semelhantes foram observados para o inibidor do feijão *Phaseolus acutifolius* (Campos et al., 1997).

A atividade inibitória de CTI, pré-incubada a diferentes pHs com variações nas temperaturas, foi avaliada após 24 horas do tratamento a 37 °C, com o objetivo de verificar se a desnaturação era reversível (dado não mostrado). Observou-se que a desnaturação de CTI até 80 °C para qualquer pH é reversível, no entanto, a 100 °C por 60 minutos, a atividade inibitória é perdida completamente.

Apesar da vasta documentação direcionada ao estudo de envelhecimento e estabilidade de proteínas a partir da desnaturação, poucos são os artigos que envolvem os inibidores de tripsina de sementes (Lehle et al., 1996; Gruen et al., 1984; Ramasarma et al., 1995). Assim, discutiremos a seguir dados interessantes sobre a estabilidade conformacional e funcional do inibidor de tripsina isolado de sementes de *Copaifera langsdorffii*, uma árvore típica do cerrado do Estado de São Paulo.

Dentre os vários métodos espectroscópicos desenvolvidos para estudar a desnaturação de proteínas, a intensidade de fluorescência é uma convincente ferramenta para detectar mudanças conformacionais em proteínas. A simplicidade da transição de um estado nativo para o estado desnaturado e suas características de reversibilidade permite uma descrição detalhada dos aspectos termodinâmicos. Assim o modelo de dois estágios (nativo e desnaturado) exprime que o equilíbrio das proteínas existe pelo menos nestas duas formas alternativas (Chiti et al., 1998).

Ramasarma et al. (1995) observaram que os inibidores de Bowman-Birk são altamente resistentes aos agentes desnaturantes, porém sua estrutura nativa e funcional é decisivamente prejudicada na presença do agente redutor DTT, sugerindo que a redução das pontes dissulfeto promoveu uma desestabilização significativa da estrutura terciária sem afetar consideravelmente a estrutura secundária.

Estudos cinéticos e estruturais dos inibidores de tripsina, após a redução das pontes dissulfeto, sugerem que a completa desnaturação dessas moléculas envolve duas fases: redução das meias cistinas seguida pela ação dos agentes caotrópicos (Lehle et al., 1996; Gruen et al., 1984; Ramasarma et al., 1995). CTI foi resistente ao desenovelamento por uréia e cloreto de guanidina em condições não reduzidas, retendo 80 % de sua atividade (dado não mostrado). Somente após a redução com DTT 1 mM, o desnaturante pode agir na molécula, confirmando que as pontes dissulfeto estão relacionadas à manutenção da estabilidade estrutural de CTI frente a agentes caotrópicos.

Esses resultados são condizentes com os inibidores de Ramasarma et al. (1995) e Gruen et al. (1984), que só foram desnaturados por cloreto de guanidina e uréia em pH 8.0 após a redução de suas pontes dissulfeto por DTT 1 mM, sugerindo que a desnaturação de CTI também é um fenômeno cooperativo à redução das pontes dissulfeto. Os gráficos de intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão derivado da desnaturação de CTI por uréia e cloreto de guanidina (Figura. 06 e 12) evidenciam um concomitante deslocamento dos picos de emissão para a região do vermelho, de 320 para, aproximadamente, 340 nm.

Um ajuste dos espectros de emissão obtidos foi realizado às funções de Lorentz correspondentes, proporcionando um melhor ajuste do que outras funções como a Gaussiana e, desta maneira, os valores de λ max para cada concentração de uréia ou cloreto de guanidina foram determinados considerando-se o centro da curva em cada caso.

O deslocamento para o vermelho (Figura 06 e 12) de aproximadamente 20 nm tanto para uréia quanto para cloreto de guanidina, ocorre devido à exposição de resíduos aromáticos que se encontram estabilizados por interações hidrofóbicas no centro da proteína. Enquanto, as alterações na intensidade de fluorescência se dá pela transferência de energia dos anéis aromáticos dos resíduos de tirosina para os resíduos de triptofano. Obviamente, a abertura conformacional leva a uma maior proximidade desses grupos e induz a um aumento da taxa dessa transferência.

As **Figura 07 e 13** evidenciam que a desnaturação por uréia ou cloreto de guanidina ocorre de maneira bastante gradual. No entanto, é visivelmente completa a partir de 3,5 e 1,2 M dos agentes caotrópicos uréia e cloreto de guanidina, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que o cloreto de guanidina é duas vezes mais forte como agente desnaturante. Observa-se ainda uma variação na intensidade de emissão (eixo y) tanto para as diferentes concentrações uréia quanto para o cloreto de guanidina. Estas variações, designadas por "histerismo", parecem estar relacionadas à exposição de resíduos aromáticos que se encontravam enterrados na matriz protéica, estabilizando interações hidrofóbicas no estado nativo de CTI.

Estudos enfocando o uso de sondas (*quenchers*) para avaliar o grau de envolvimento e quantidade de resíduos de triptofano expostos nas mudanças conformacionais de proteínas (resultante da interação enzima-substrato) tem sido amplamente registrado (Ramasarma et al., 1995). Com os dados da estrutura primária de CTI disponíveis, seria interessante estudar detalhadamente o envolvimento dos resíduos aromáticos na estabilidade funcional de CTI.

O $\Delta G^{\circ}H_2O$ é o valor de ΔG na ausência do desnaturante e representa a estabilidade conformacional da molécula, isto é, quão mais estável a proteína é na conformação nativa (globular) do que nas conformações desnaturadas. O valor de $\Delta G^{\circ}H_2O$ não deve ser tomado isoladamente a fim de avaliar a estabilidade de uma macromolécula. Assim, um outro parâmetro utilizado é o valor de m , que representa o intercepto da transição desnaturante, ou seja, a medida da dependência do ΔG em relação à concentração do desnaturante [D], sendo a própria concentração do desnaturante.

Através dos valores máximos de comprimento de onda de emissão (λ_{max}) foi possível fazer o cálculo da fração desnaturada para ambos agentes caotrópicos (**Figura 8 e 14**), obtendo-se uma curva de desnaturação simples, sugerindo um mecanismo de desnaturação que envolva pelo menos dois estágios, nativo e desnaturado, permitindo utilizar o método de Pace, (1990) para calcular os parâmetros termodinâmicos da desnaturação. Assim, os valores de m obtidos foram de 0,063 e 0,054 mol⁻¹ para as desnaturações por uréia e cloreto de guanidina, respectivamente (**Tabela 01**).

Os valores de $\Delta G^{\circ}H_2O$ (**Tabela 01**) de aproximadamente 60 kcal mol⁻¹, para ambos os agentes desnaturantes, foram concordantes nos dois experimentos, havendo um desvio inferior a 0,02 %, mostrando que o método de Pace (1990) é extremamente adequado para o

cálculo dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação reversível e, que o valor de variação de energia livre do processo de desnaturação está relacionado com a proteína, mas não com os agentes desnaturantes utilizados.

Tabela 01 - Parâmetros característicos da desnaturação do inibidor CTI por uréia e GdnHCl.

Desnaturante	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	$D_{1/2}$ (M)	ΔG (H ₂ O) (Kcal mol ⁻¹)
Uréia	0.063	3.25	63.0
GdnHCl	0.054	1.5	54.0

O mecanismo de desnaturação do tipo dois-estágios encontrado para o inibidor CTI, também já foi observado para outros inibidores de tripsina (Lehle et al., 1994) e o deslocamento do centro de massa também tem sido demonstrado para várias outras proteínas, como aquela do vírus do mosaico do tabaco (Bonafé et al., 1998). A perda total da atividade inibitória evidenciada, como era de se esperar, confirma que a integridade protéica conformacional é extremamente importante para a atividade inibitória de CTI (Chen et al., 1997).

A renaturação ou enovelamento de proteínas após a diluição ou diálise do agente desnaturante tem sido analisada por várias técnicas, entre elas a fluorescência, dicroísmo circular e o monitoramento da atividade inibitória. O estudo de enovelamento tem sido de extrema importância na detecção de intermediários entre os estados nativo e desnaturado (Hammarstrom et al., 2001; Jaenicke, 1999). A renaturação de CTI não foi observada após diluições (100 e 1000 vezes) do agente desnaturante (dado não mostrado). Este fato deve ser atribuído à baixa concentração do inibidor após diluição ou interferência do agente caotrópico diretamente na enzima tripsina. Assim, utilizou-se o método de diálise do agente desnaturante para avaliar a renaturação estrutural e funcional de CTI.

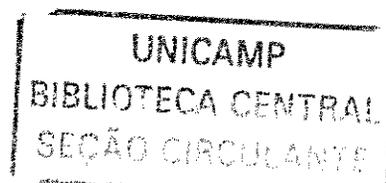
A renaturação ou enovelamento foi acompanhado por medidas de fluorescência para CTI desnaturado por uréia ou cloreto de guanidina após diálise nos intervalos de tempo de 15, 30 minutos e 6 horas (Figura 09 e 15). Observou-se que CTI, tratado com uréia 8 M e DTT 1 mM enovela-se após 15 minutos de diálise, ocorrendo um deslocamento de 340 nm (CTI desnaturado) para 320 nm (CTI dialisado). Este fato ganha reforço na Figura 11, que evidencia uma curva linear para a recuperação da atividade inibitória em função do tempo de diálise.

A renaturação de CTI desnaturado por cloreto de guanidina 6 M, em termos estruturais, só ocorreu após 6 horas de diálise como pode ser observado na **Figura 13**. Contudo, a **Figura 15** evidencia que a atividade inibitória de CTI em função do tempo de diálise não é proporcional, sendo a recuperação rápida até 100 minutos de diálise e a estabilização alcançada em aproximadamente, 40 %. Estudos adicionais, utilizando dicroísmo circular na região *far-UV* e *near-UV* poderiam revelar dados interessantes da estrutura secundária e terciária de CTI durante o processo de re-enovelamento, bem como, evidenciar as propriedades estruturais e cinéticas dos estados intermediários parcialmente enovelados.

O estudo da estabilidade utilizando agentes caotrópicos demonstrou que, o mecanismo de desnaturação por cloreto de guanidina ou uréia foram similares, iniciando imediatamente a partir de 0.5 M para ambos agentes caotrópicos. Contudo, diferenças são observadas em termos estruturais e funcionais. A desnaturação por uréia evidenciou que CTI apresenta 100 % de atividade inibitória para tripsina no início da desnaturação do inibidor, com aproximadamente 0,5 M de agente caotrópico.

Por outro lado, quando se inicia o processo de desnaturação por cloreto de guanidina na concentração de 0,5 M, CTI apresentava aproximadamente 90 % de atividade inibitória, que é completamente eliminada em concentrações superiores a 2.0 M de cloreto de guanidina. A presença de 3.5 M de uréia ou GdnHCl inibiu 50 % e 100 % da atividade inibitória, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciam uma completa inativação de CTI por GdnHCl antes do desenovelamento completo do inibidor. Contudo, a perda da atividade antitriptica de CTI foi concomitante ao desenovelamento quando a uréia foi utilizada.

O valor de ΔG (H_2O) do inibidor CTI desnaturado por cloreto de guanidina, assim como na presença de uréia, está de acordo com os relatos na literatura para inibidores de tripsina do tipo Kunitz. (Gruen et al., 1984). Análises das curvas de desnaturação por estes dois agentes caotrópicos no inibidor indicam que, embora o cloreto de guanidina seja cerca de duas vezes mais potente que a uréia, o valor de ΔG (H_2O) obtido dos dois desnaturantes estão em excelente concordância (**Tabela 01**). Valores próximos de ΔG (H_2O) ($51,8 \text{ kcal mol}^{-1}$) também foram observados para outras proteínas utilizando como desnaturantes uréia e cloreto de guanidina (Jaenicke, 1999).



VI. CONCLUSÕES

- Os resultados de pureza permitiram a obtenção de cristais da proteína CTI e a determinação da estrutura tridimensional por meio de difração de raios-X. Os experimentos de determinação da estrutura primária e de determinação do modelo molecular tridimensional permitiram concluir que o inibidor CTI é uma molécula constituída por duas subunidades onde a soma das massas das subunidades é similar à massa molecular (20 kDa) do clássico inibidor de Kunitz, corroborando a hipótese de que as subunidades de CTI fazem parte de uma proteína precursora que passou por clivagem pós traducional, sendo as razões para esta clivagem desconhecidas, assim como tem sido observado para os inibidores de Kunitz purificados de sementes de *Mimosoideae*.
- Confirmou-se que esse inibidor difere dos demais membros da família Kunitz por possuir apenas uma ponte dissulfeto, sugerindo a possibilidade de tratar-se de um inibidor com estágios evolutivos intermediários em relação aos demais membros. Contudo, chama-se a atenção para a perda evolutiva da segunda ponte dissulfeto que faria a união de ambas subunidades. Sugere-se que, em situações fisiológicas, as subunidades de CTI purificadas de sementes de *Copaíba* encontrem-se dimerizadas por interações fracas, facilmente desfeitas em certas condições de pH, temperatura e interação com proteases, o que poderia ter resultado em atividade inibitória para tripsina na subunidade menor, como pode ser observado nos experimentos de caracterização funcional de CTI.
- As razões estruturais para a alta atividade inibitória de CTI contra tripsina, residem no fato de que a conformação canônica do *loop* reativo é mantida, a despeito da presença de duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas e da falta de uma das pontes dissulfeto características da família STI Kunitz. Apesar das diferenças estruturais, o contato de CTI com a enzima tripsina na formação do complexo é mantido não apenas nas regiões dos sítios ativos da tripsina e reativo de CTI, mas, existe uma densa rede de pontes de hidrogênio efetiva na interface de contato entre as moléculas, envolvendo várias partes das moléculas e preservando a integridade do complexo.

- A seqüência deduzida a partir da interpretação do mapa de densidade eletrônica é coerente com a seqüência bioquimicamente determinada por gel de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, apresentando aproximadamente 75 % de similaridade. Esse fato pode ser explicado pela enorme variedade de isoformas observadas nas proteínas de sementes. Confirmou-se que o resíduo arginina seqüenciado para a posição 64 do sítio reativo é de extrema importância na atividade funcional do inibidor CTI. A inibição da atividade de CTI para tripsina foi observada principalmente para os modificadores EDC e PGO, indicativo de que os resíduos de Asp, Glu e Arg são importantes em conjunto para atividade de CTI. As cinéticas de inativação para os dois reagentes mostraram-se tempo e concentração dependente, indicando que o resíduo de arginina da posição P1 é primordial para a atividade inibitória contra tripsina, mas que resíduos de Asp e Glu próximo ao sítio reativo podem exercer papéis fundamentais na atividade inibitória.

- CTI, um inibidor atípico da família Kunitz mostrou-se estável funcionalmente às concentrações finais de 1, 10 e 100 mM do agente redutor DTT. Porém, estruturalmente desestabilizado em sua estrutura quaternária (como confirmado em gel de eletroforese SDS-Tricina) gel filtração em coluna de exclusão, mas ausente de alterações na estrutura terciária como evidenciado nos espectros de fluorescência. Os dados confirmaram que os inibidores da família Kunitz possuem uma estabilidade conformacional surpreendente, sendo desestabilizada pela redução das pontes dissulfeto.

- CTI é demasiadamente estável em meio ácido mesmo em elevadas temperaturas, com 100 % de atividade inibitória e instável em meio alcalino, principalmente em temperatura acima de 60 °C. Estudos utilizando agentes caotrópicos uréia e cloreto de guanidina evidenciou que CTI é extremamente estável quando nativo, conservando aproximadamente 80 % de atividade inibitória. Contudo, há desnaturação quando na presença do agente redutor DTT, indicativo de que a estrutura quaternária não é importante para a atividade funcional de CTI, mas protege o inibidor de agentes desnaturantes.

- A desnaturação de CTI mostrou ser um processo reversível, após diálise, para estrutura e função no caso da uréia e cloreto de guanidina. Os estudos sistemáticos da desnaturação reversível indicaram que o desenovelamento de CTI envolve pelo menos dois estágios, nativo e desnaturado. A presença de 3.5 M de uréia ou GdnHCl inibiu 50 % e 100 % da atividade inibitória, respectivamente. Ambos agentes caotrópicos promoveram um deslocamento do centro de massa, sendo possível calcular o ΔG (H₂O) em função da concentração de uréia e guanidina, sendo 63.0 e 54.0 Kcal mol⁻¹, respectivamente.
- Os resultados obtidos evidenciam uma completa inativação de CTI por GdnHCl antes do desenovelamento completo do inibidor, contudo a perda da atividade antitriptica de CTI foi concomitante ao desenovelamento quando a uréia foi usada. Estes resultados convergem para um melhor entendimento de como as particularidades da estrutura primária de CTI se desnaturam e renaturam apresentando uma função biológica, bem como, contribuir para esclarecer alguns pontos do mecanismo de ação destas proteínas.
- Esses dados contribuíram decisivamente para a caracterização físico-química dos inibidores de sementes de leguminosas da subfamília Caesalpinoideae, sendo importantes modelos para o estudo do processo de evolução dessas plantas. Embora os estudos sobre as propriedades dos inibidores de enzimas proteolíticas sejam amplos, os resultados demonstram que uma investigação detalhada das particularidades estruturais de proteínas de sementes do Cerrado pode contribuir para uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessas moléculas e, possivelmente, esclarecer um pouco mais da função biológica destes nas sementes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, J.P., (1997). Bias Reduction in Phase Refinement by Modified Interference Functions: Introducing the gamma Correction. *Acta Crystallogr. D Biol.* **53**: 371-6.
- Alomirah, H.F.; Alli, I.; Konishi, Y., (2000). Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides. Review. *J Chromat. A.* **893**:1-21.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andersen, J.S.; Svensson, B.; Roepstorff, P., (1996). Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nat. Biotechnol.*, **14**: 449-457.
- Barbirz, S.; Jakob, U.; Glocker, M.O., (2000). Mass spectrometry unravels disulfide bond formation as the mechanism that activates a molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* **275**: 18759 -18766.
- Batista, I.F.C. (1997). Estrutura e especificidade de inibidores do tipo SBTI da família Kunitz das sementes de *Bauhinia unguolata*, *Bauhinia variegata*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Leucaena leucocephala* e *Swartzia pickelli*. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Batista, I.F.C.; Oliva, M.L.V.; Araújo, M.S.; Sampaio, M.U.; Richardson, M.; Fritz, H.; Sampaio, C.A.M. (1996). Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, **41**:1017-1022.
- Belitz, H.D. & Weder, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Ver. Int.*, **6**: 151-211.
- Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H.M., (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*, **266**:75-81.
- Bevan, M.; Bancroft, I.; Bent, E.; Love, K.; Goodman, H.; Dean, C.; Bergkamp, R.; Dirkse, W.; Van Staveren, M.; Stiekema, W.; Drost, L.; Ridley, P.; Hudson, S.A.; Patel, K.; Murphy, G.; Piffanelli, P.; Wedler, H.; Wedler, E.; Wambutt, R.; Weitzenegger, T.; Pohl, T.M.; Terry, N.; Gielen, J.; Villarroel, R.; Chalwatzis, N., (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **391**: 438-490.
- Birk, Y., & Applebaum, Y. (1985) The Bowman-Birk inhibitor: Trypsin and Chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int. J. Pept. Res.*, **25**: 113-131.
- Birk, Y., & Applebaum, Y. (1994). Protein proteinase inhibitors in legume seeds – overview. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, **44**: 26S-30S.
- Bischoff, R. & Luidier, T.M. (2004). Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J. Chromat. B*, **803**: 27-40.

- Blessing, R.H., & Smith, G.D. (1999). Difference structure factor normalization for heavy-atom or anomalous-scattering substructure determinations, *J. Appl. Crystallog.* **32**: 664-670.
- Blum, H.; Bier, H.; Gross, H.J., (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-95.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, **204**: 433-441.
- Bode, W. & Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 241-252.
- Boivin, D.; Lin, W.; Béliveau, R. (1997). Essential arginine residues in isoprenylcysteine protein carboxyl methyltransferase. *Biochem. Cell Biol.*, **75**: 63-69.
- Bonafé, C.F.S.; Vital, C.M.R.; Telles, R.C.B.; Gonçalves, M.C.; Matsuura, M.S.A.; Pessine, F.B.T.; Freitas, D.R.C.; Veja, J., (1998). Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry*. **37**: 11097-11105.
- Bowman, D.E. (1946). Differentiation of soybean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**: 547-550.
- Branden, C. & Tooze, J. (1991). *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing.
- Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1988). The effect of protein plant quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.*, **34**: 1111-1117.
- Broadway, R. M., (1995). Are insects resistant to plant Proteinase inhibitors? *J. Physiol.*, **2**: 107-116.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstle, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., (1998). *Acta Crystallographica section D*, **56**: 905-921.
- Bulone, V.; Lam, B.; Stone, B. (1999). The effect of amino acid modifying reagents on the activity of a (1-3)- β -glucan synthase from Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) endosperm, *Phytochemistry*, **50**: 9-15.
- Campos, J.E.; Martinez-Gallardo, N.; Mendiola-Olaya, E.; Blanco-Labra, A. (1997). Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. *J. Food Biochem.* **21**: 203-218.
- Cavalcanti M.S.M.; Oliva M.L.; Fritz, H.; Jochum, M.; Mentele, R.; Sampaio, M.; Coelho, L.C.; Batista, I.F.; Sampaio, C.A. (2002). Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**: 635-639.
- Cecilian, F.; Tava, A.; Iori, R.; Mortarino, M.; Odoardi, M.; Ronchi, S. (1997). A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochemistry*, **44**: 393-398.

- Chen, S.L.; Chen, Q.X.; Yang, P.Z.; Qiu, W.J.; Wang, L.T.; Zhou, H.M.; (1997). Unfolding and inactivation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase during denaturation by guanidine hydrochloride. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**: 517-526.
- Chiti, F.; van Nuland, N.A.J.; Taddei, N.; Magherini, F.; Stefani, M.; Ramponi, G.; Dobson, C M. (1998). Conformational stability of muscle acylphosphatase: the role of temperature, denaturant concentration, and pH. *Biochemistry*. **37**: 1447-1455.
- Christeller, J.T.; Lanig, W.A.; Markick, N.P.; Burgess, E.P.J. (1992). Midgut proteases activities in 12 phytophagous lepidoteran larvae: dietary and protease inhibitors interaction. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **22**: 735-746.
- Collins, J.F. & Coulson, A.F.W. (1990). Significance of protein sequence similarities. *Meth Enzymol.* **183**: 474-486.
- Copert, F.; Gouzy, J.; Kahn, D. (1998). The ProDom database of protein domain families. *Nucl. Acids Res.* **26**, 323 - 326.
- Cronquist, A. (1988). The classification of flowering plants. Boston, Houghton Mifflin Co. 396p.
- De Souza, E.M.; Teles, R.C.; de A. Siqueira, E.M.; Freitas S.M. (2000). Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *J. Prot. Chem.* **19**: 507-513.
- DeClerck, Y.A. & Imren, S. (1994). Protease Inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer*, **30 A**: 2170-2180.
- Deutscher, M. P. (1990) Guide to Protein Purification – *Meth. in Enzym.* Academic Press, 894p.
- Di Ciero, L.; Oliva, M.I.V.; Torquato, R.; Kohler, P.; Weder J.K.P.; Novello J.C.; Sampaio, C.A.M.; Oliveira, B.; Marangoni, S. (1998). The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds. *J. Prot. Chem.*, **17**: 827-834.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins – A Practical Approach.* Irl Press – Oxford University Press, New York, 331p.
- Duranti, M. & Gius, C.; (1997). Legume seeds: protein content and nutritional value *Field. Crop. Res.* **53**: 31-45.
- Edman, P. & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**: 80-91.
- Finzel, B.C.; Clancy, L.L.; Holland, D.R.; Muchmore, S.W.; Watenpaugh, K.D.; Einspahr, H.M. (1989). Crystal structure of recombinant human interleukin - 1 β at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **209**: 779-791.
- Franco, O.L.; Grossi de Sá, M.F.; Sales M.P.; Mello, L.V.; Oliveira, A.S.; Rigden, D.J. (2002). Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins*, **15**: 335-341.

- Gans, P.J.; Lyer, P.C.; Manning, M.; Woody, R.W.; Kallembach, N.R. (1991). The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers*, **31**: 1605-1614.
- Gatehouse, A. M. R. (1979). Antinutricional proteins en plants. *Food Prot.*, **30**: 245-293.
- Gatehouse, A.M.R.; Butler, K.J.; Fenton, K.A.; Gatehouse, J.A., (1985). Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomol. Exp. appl.*, **39**: 279-286.
- Gatehouse, A.M.R.; Shi, Y.; Powel, K.S.; Brough, C.; Hilder, V.A.; Hamilton, W.D.O.; Newell, C.A.; Merryweather, A.; Boulter, D.; Gatehouse, J.A. (1993). Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philosophical Trans. Royal Soc. London Serie B.* **342**: 279-286.
- Gehrig, P.M. & Biemann, K. (1996). Assignment of the disulfide bonds in napin, a seed storage protein from *Brassica napus*, using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Peptide Res.* **9**: 308-314.
- Genove, N.; Goshev, I.; Nikolova, D.; Georgieva, D.N.; Filippi, B.; Svendsen, I. (1997). A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. *Biochim. Biophys. Acta.* **1341**: 157-164.
- Graves, B.J.; Hatada, M.H.; Hendrickson, W.A.; Miller, J.K.; Madison, V.S.; Satow, Y. (1990). Structure of Interleukin 1 α at 2.4 Å resolution, *Biochemistry*, **29**: 2679-2689.
- Green, T.R. & Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible mechanism against defense insects. *Science*, **175**: 776-777.
- Greenfield, N. & Fasman, G.D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**: 4108-4116.
- Greenfield NJ. (2004). Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. *Meth. Mol Biol.* **261**: 55-78.
- Grinberg, V.Y.; Burova, T.V.; Haertlé, T.; Tolstoguzov, V.B. (2000). Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *J. Biotechnol.* **79**: 269-280.
- Gruen L.C.; Tao, Z.J., Kortt, A.A. (1984). Stability and physicochemical properties of a trypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L)DC). *Biochim. Biophys Acta.* **791**: 285-293.
- Gurjar, M.M.; Khan, M.I.; Gaikwad, S.M. (1998). Alpha-Galactoside binding lectin from *Artocarpus hirsuta*: characterization of the sugar specificity and binding site. *Biochim Biophys Acta.* **1381**: 256-264.
- Habazettl, J.; Gondol, D.; Wiltscheck, R.; Otlewski, J.; Schleicher, M.; Holak, T. A. (1992). Structure of hisactophilin is similar to interleukin-1b and fibroblast growth factor, *Nature* **359**: 855-858.

- Hall, A.E.; Singh, B.B.; Ehlers, J.D. (1997). Cowpea breeding. *Plant Breed. Rev.* **15**: 217-274.
- Ham, W.E.; Sandstedt, R.M.; Mussehl, F.E. (1945). The proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal and its effect upon growth in chicks. *J. Biol. Chem.*, **161**: 635-642.
- Hammarstrom, P.; Persson, M.; Carlsson, U. (2001). Protein compactness measured by fluorescence resonance energy transfer. Human carbonic anhydrase ii is considerably expanded by the interaction of GroEL. *J. Biol. Chem.* **276**: 21765-21775.
- Hejgaard, J.; Dam, J.; Petersen, L.C.; Bjorn, S.E. (1994). Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, **1204**: 68-74.
- Heussen-Schemmer, C.; Merrifield, E.H.; Dowdle, E.B.D. (1991). The *Erythrina* protease inhibitor: Interactions with tissue plasminogen activator. *Thromb. Hemost.*, **66**: 226-231, 1991.
- Hilder, V.A. & Boulter, D., (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*. **18**: 177-191.
- Hung, C.H.; Lee, M.C.; Lin, J.Y. (1994). Inactivation of *Acacia confusa* trypsin inhibitor by site-directed mutagenesis, *FEBS Lett.*, **353**: 312–314.
- Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1996). PROMOTIF – a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Prot. Sci.* **5**: 212-220.
- Ikenaka, T.; Odani, S.; Koide, T. (1974). Chemical structure and inhibitory activities of soybean proteinase inhibitors. In: Fritz, Tschesche, Greene & Truscheit – Proteinase Inhibitors, Berlin, Spring Verlag, 325-343.
- Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **71**: 155-241.
- Jenö, P.; Mini, T.; Moes, S.; Hintermann, E.; Horst, M. (1995). Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **224**: 75-82.
- Johnson, K.A.; Lee, M.J.; Brough, C.; Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Gatehouse J.A. (1995). Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**: 375-383.
- Jones, T.A.; Bergdoll, M.; Kjeldgaard, M. (1990). In *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*. (Bugg, C.; Ealick, S., Eds.), 189–195, Springer-Verlag Press.
- Jongsma, M. A. & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors (Review). *J. Insect Physiol.*, **43**: 885-895.
- Joubert, F.J.; Heussen, C.; Dowdle, E.B.D. (1985). The complete amino acid sequence of trypsin inhibitor DE-3 from *Erythrina latissima* seeds. *J. Biol. Chem.* **260**: 12948-12953.
- Joubert, F.J. & Sharon, N. (1985). Proteinase inhibitors from *Erythrina corallodendron* and *Erythrina crista-galli* seeds. *Phytochemistry*, **24**: 1169-1179.

- Joubert, F.J. (1981). Purification and some properties of a proteinase inhibitor (DE-1) from *Peltophorum africanum* (Weeping Wattle) seed. *Hoppe - Seylers . Physiol. Chem.*, **362**: 515-521.
- Joubert, F.J.; Merrifield, E.H.; Dowdle, E.B. (1987). The reactive sites of proteinase inhibitors from *Erythrina caffra* seeds. *Int. J. Biochem.*, **19**: 601-606.
- Kalume, D.E.; Sousa, M.V.; Morhy, L. (1995). Purification, characterization, sequence determination, and mass spectrometric analysis of a Trypsin inhibitor from seeds of a Brazilian tree *Dipteryx alata*. *J. Prof. Chem.*, **14**: 685-693.
- Kelly, S. M. & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1338**: 161-185.
- Kendrew, J.C. (1961). The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.*, **205**: 96-111.
- Kennedy, A.R. (1998). Chemo preventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, **78**: (3).167-209.
- Kim, S-H.; Hara, S.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Toda, H.; Kitamura, K.; Kaizuma, N. (1985). Comparative study on amino acid sequences of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Tia, Tib, and Tic. *J. Biochem.*, **98**: 435-448.
- Kitich, L.W. & Murdick, L.L. (1987). Partial characterization of a major proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* (F.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **3**: 561-576.
- Knight, D.G. (1986). The characterization of enzymes inhibitors. In: Barret, A.J. and Salvesen, N° G.; ed., *Proteinases inhibitors*. Amsterdam, Elsevier, p.23-51.
- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. Fragmentation of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by limited proteolyses and by chemical cleavage. *Eur. J. Biochem.*, **32**: 401-407.
- Koide, T.; Tsunasawa, S.; Ikenaka, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.*, **32**: 408-416.
- Kouzuma, Y.; Yamasaki, N.; Kimura, M. (1997). The tissue type plasminogen activator inhibitor ETIa from *Erythrina variegata*: Structural basis for the inhibitory activity by cloning, expression, and mutagenesis of the cDNA encoding ETIa. *J. Biochem.*, **121**: 456-463.
- Krauchenco, S.; Nagem, R.A.; Silva, J.A.; Marangoni, S.; Polikarpov, I., (2004). Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie*. **86**:167-72.
- Krauchenco, S.; Silva, J.A.; Nagem, R.A.; Brandão-Neto, J.R.; Forrer, V.P.; Ferreira, R.; Macedo, M.L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. and Polikarpov, I. (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. *Acta Crystal. Section D-Biol. Crystal.*, **57**: 1316-1318.

- Kunitz, M. (1945). Crystallization of the trypsin inhibitor from soybean. *Science*, **1011**: 668-669.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General Properties. *J. Gen. Physiol.*, **30**: 291-310.
- Kyte, J. (1995). *Structure in Protein Chemistry*, Garland Publishing.
- La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods, *Meth. Enzymol.*, **276**: 472-494.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lakowicz, J.R. (1983), In: Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York, 341-379.
- Laskowski, M. & Cassim, M.A. (2000). What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 324-37.
- Laskowski, M.Jr. & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**: 593-626.
- Lehle, K.; Wrba, A.; Jaenicke, R. (1994). Erythrina trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide groups, *J. Mol. Biol.* **239**: 276-284.
- Lehle, K.; Kohnert, U.; Stern, A.; Popp, F.; Jaenicke, R.; (1996). Effect of disulfide bonds on the structure, function, and stability of the trypsin/TPA inhibitor from *Erythrina caffra*: Site-directed mutagenesis, expression, and physicochemical characterization. *Nature Biotech.* **14**: 476-480.
- Levy, H. M.; Leber, P.D.; Ryan, E.M. (1963). Inactivation of myosin by 2,4-dinitrofenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.* **238**: 3654.
- Liener, I.E. (1996). Effects of processing on antinutritional factors in legumes: the soybean case. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **44**: 48S-54S.
- Liu, Y.; Chirino, A.J.; Misulovin, Z.; Leteux, C.; Feizi, T.; Nussenzweig, M.C.; Bjorkman, P. (2000). Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand, *J. Exptl. Med.* **191**: 1105-1115.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras - Manual de identificação e Cultivo de plantas nativas do Brasil. Editora Platarum LTDA: 1.
- Lorito, M.; Broadway, R.M.; Hayes, C.K.; Woo, S.L.; Williams, D.L.; Harman, G.E. (1994). Proteinase inhibitors in plant as a novel class of fungicides. *Mol. Plant Microbe Interact*, **7**: 525-527.
- Macedo, M.L.R.; Mello, G.C.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Matos, D.G.G. (2002a). Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 891-898.

- Macedo ML, Freire MG, Novello JC and Marangoni S., (2002b). *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta.*, **1571**: 83-88.
- Maeda, K. (1986). The complete amino acid sequence of the endogenous α -amylase inhibitors in wheat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **871**: 250-256.
- Mann, M. & Wilm, M. (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 219-224.
- Mann M.; Hendrickson R.C.; Pandey A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 437-473.
- Markwick, N.P.; Reid, S.J.; Laing, W.A.; Christeller, J.T. (1995). Effect of dietary protein and proteinase inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, **88**: 33-39.
- Matthews, B.W., (1977). X-ray structure of proteins. In Neurath, H., and Hill, R.L. (eds), *The Proteins* (3rd ed.), vol 3, 404-590. Academic Press.
- Mekhedov, S.; de Ilarduya, O.M.; Ohtrogge, J. (2000). Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol.*, **122**:389-402.
- McCoy, A.J. & Kortt, A.A. (1997). The 1.8 Å crystal structure of winged bean albumin 1, the major albumin from *Psophocarpus tetragonolobus*, *J. Mol. Biol.* **269**: 881-891.
- McLachlan, A.D. (1979). Three-fold structural pattern in the soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *J. Mol. Biol.*, **133**: 557-563.
- McPerson, A. (1982). *Preparation and analysis of protein crystals*. John Wiley, New York.
- Melo, G.C.; Oliva, M.L.V.; Sumikawa, J.T.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. (2001). Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J. P. Chem.*, **20**: 625-632.
- Mhatre, R., Woodard, J.; Zeng, C. (1999). Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 2503-2510.
- Minuth, T.; Krämer, B.; Lehle, K.; Jaenicke, R.; Kohnert, U. (1998). The spectroscopic analysis, inhibition and binding studies demonstrate the equivalence of *Erythrina caffra* trypsin inhibitor and the recombinant substitution variant recSerETI. *J. Biotechnol.*, **62**: 213-239.
- Monte-Negreiros, A.N.; Carvalho, M.M.; Xavier-Filho, J.; Blanco-Labra, A.; Shewry, P.R.; Richardson, M. (1991). The complete amino acid sequence of a major Kunitz trypsin inhibitor from seeds of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*. **30**: 2829-2833.
- Morrison, J.F. (1982). The slow-binding and slow tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. *Trends Biochem. Sci.*, 102-105.
- Mosolov, V.V. (1995), Protein inhibitors of proteinases and α -amylases in plants (an review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, **31**: 3-7.

- Mukhopadhyay, D. (2000) The Molecular Evolutionary History of a Winged Bean Alpha-Chymotrypsin Inhibitor and Modeling of Its Mutations Through Structural Analyses, *J. Mol. Evol.* **50**: 214–223.
- Mulkerrin, N.G., (1996). *Protein structure analysis using circular dichroism*, in Spectroscopy Methods for Determining Protein Structure in Solution, H.A. Havel, Ed., VCH Publishers, Inc., New York. 5-27.
- Murzin, A.G.; Lesk, A.M.; Chothia, C. (1992), Beta-trefoil fold. *J. Mol. Biol.* **223**, 531-543.
- Nagem, R.A.P.; Dauter, Z.; Polikarpov, I. (2001). Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers, *Acta Cryst. D.*, **57**: 996–1002.
- Neurath, H. (1993). The regulation of protease action: An Overview. In: Innovations in proteases and their inhibitors (Avilés, F.X.ed.). Editora de Gruyeter, Berlin.
- Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. (1988). Distribution of the Kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in leguminosae seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 1245-1252.
- Notenboom, V.; Boraston, A.B.; Williams, S.J.; Kilburn, D.G.; Rose, D.R. (2002). High resolution crystal structures of the lectin-like xylan binding domain from *Streptomyces lividans* xylanase 10A with bound substrates reveal a novel mode of xylan binding, *Biochemistry* **41**: 4246–4254.
- Odani, S.; Ono, T.; Ikenaka, T. (1979). Proteinase inhibitors from a Mimosoideae legume, *Albizia julibrissin*. *J. Biochem.*, **86**: 1795-1805.
- Ohba H.; Nishikawa, M.; Kimura, M.; Yamasaki, N.; Moriwaki, S.; Itoh, K. (1998). Cytotoxicity induced by *Erythrina variegata* serine proteinase inhibitors in tumor hematopoietic stem cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **62**: 1166-1170.
- Ohtsubo, K. & Richardson, M. (1992). The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/ α -amylase inhibitor from brain of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *FEBS Lett.*, **309**: 68-72.
- Oliva, M.L.V.; Sallai, R.C.; Sampaio, C.A.M.; Fritz, H.; Auerswald, E.A.; Tanaka, A.S.; Torquato, R.J.S.; Sampaio, M.U. (1996). *Bauhinia* serine proteinase inhibitors: effect on factor X, factor XII and plasma Kallikrein. *Immunopharmacology*, **32**: 85-87.
- Oliva, M.L.; Mendes, C.R.; Santomauro-Vaz, E.M.; Juliano, M.A.; Mentele, R.; Auerswald, E.A.; Sampaio, M.U.; Sampaio, C.A.; (2001). *Bauhinia bauhinioides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr. Méd. Chem.*, **8**:977-984.
- Oliveira, A.S.; Pereira, R.A.; Lima, L.M.; Morais, A.H.A.; Melo, F.R.; Franco, O.L.; Bloch Jr, C.; Grossi-de-Sa, M.F.; Sales M.P. (2002). Activity toward Bruchid Pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pest. Biochem. Physiol.*, **72**: 122-132.
- Onesti, S.; Brick, P.; Blow, D.M. (1990). Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.*, **217**: 153-176.

- Ono, S.; Yamakita, Y.; Yamashiro, S.; Matsudaira, P.T.; Gnarr, J.R.; Obinata, T.; Matsumura, F. (1997). Identification of an actins binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascine, *J. Biol. Chem.* **272**: 2527–2533.
- Oppert, B.; Morgan, T.D.; Culberson, C.; Kramer K.J. (1993). Dietary mixture of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle *Tribolium*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105C**: 379-385.
- Otwinowski, Z. (1993). Data Collection and Processing, in *Proceedings of the CCP4 Study Weekend* (Sawyer, L., Isaacs, N., and Bailey, S., Eds.), pp. 56–62, SERC Daresbury Laboratory, Daresbury, England.
- Pace, C.N. (1990). Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.*, **8**: 93-98.
- Paiva, L. A., Rao, V. S., Gramosa, N. V., Silveira, E. R., (1998). Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol.* **62**: 73-78.
- Paiva, P.M.G.; Souza, A.F.; Oliva M.L.V.; Kennedy, Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B.; Sampaio; C.A.M. (2003). Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Biores. Technol.*, **88**:75-79.
- Pando, L.A.; Di Ciero, L.; Novello, J.C., Oliveira, B.; Weder, J.K.P.; Marangoni, S. (1999). Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. *IUBMB Life*, **48**: 519-523.
- Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero L.; Novello; J.C.; Marangoni, S. (2001). Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, **57**: 625–631.
- Perrakis, A.; Sixma, T.K.; Wilson, K.S.; Lamzin, V.S. (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models, *Acta Cryst. D.* **5**: 448–455.
- Pisulewska, E. & Pisulewski, P.M. (2000). Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vetch, lentils and Soya beans) as affected by the technique of harvest. *Animal Food Sci. Technol.*, **86**: 261-265.
- Plotnikov, A.N.; Eliseenkova, A.V.; Ibrahim, O.A.; Shriver, Z.; Sasisekharan, R.; Lemmon, M.A.; Mohammadi, M. (2001). Crystal structure of fibroblast growth factor 9 reveals regions implicated in dimerization and auto inhibition, *J. Biol. Chem.*, **276**: 4322–4329.
- Polikarpov, I.; Oliva, G.; Castellano, E.E.; Garratt, R.; Arruda, P.; Leite, A.; Craievich, A.; (1998). Protein crystallography station at LNLS, The Brazilian National Synchrotron Light Source, *Nucl. Instrum. Meth.*, **A405**: 159–164.
- Polikarpov, I.; Perles, L. A.; de Oliveira, R. T.; Oliva, G.; Castellano, E. E.; Garratt, R.; Craievich, A. (1997). *J. Synchrotron Rad.* **5**: 72-76.

- Ponting, C.P. & Russell, R.B. (2000). Identification of distant homologues of FGFs suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins, *J. Mol. Biol.* **302**: 1041–1047.
- Prakash, B.; Selvaraj, S.; Murthy, M.R.N.; Sreerama, Y.N.; Rao, D.R.; Gowda, L.R. (1996). Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. *J. Mol. Evol.*, **42**: 560-569.
- Priestle, J.P.; Schär, H.P.; Grütter, M. (1988). Crystal structure of the cytokine interleukin-1 β , *EMBO J.* **7**(2): 339–343.
- Ramasarma, P.R.; Rao, A.G.A.; Rao, D.R. (1995). Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**: 35–42.
- Ravichandran, S.; Dasgupta, J.; Chakrabarti C.; Ghosh S.; Singh, M.; Dattagupta, K.K. (2001). The role of Asn 14 in the stability and conformation of the reactive-site loop of winged bean chymotrypsin inhibitor: crystal structures of two point mutants Asn14-> Lys and Asn 14 -> Asp. *Prot. Engin.*, **14**: 349-357.
- Ravichandran, S.; Sen, U.; Chakrabarti, C.; Dattagupta, J.K. (1999). Cryocrystallography of a Kunitz-type serine protease inhibitor: the 90 K structure of winged bean chymotrypsin inhibitor (WCI) at 2.13 Å resolution. *Acta Crystal. D Biol.*, **55**: 1814-1821.
- Read, J.W. & Haas, L.W. (1938). Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity, *Cereal Chem.*, **15**: 59-68.
- Rhodes, G., (1993). *Crystallography Made Crystal Clear*, Academic Press.
- Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methodos in Plant Biochemistry, Amino acids, proteins and nucleic acids* Vol. 5: (ed. Rogers, L. J.).
- Richardson, M.; Campos, F.A.P.; Xavier-Filho, J., Macedo, M.L.R., Maia, G.M.C., Yarwood, A. (1986). The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE 5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.), *Biochem. Biophys. Acta*, **872**:134-140.
- Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, **16**: 159-169.
- Rosenfeld, J.; Capdevielle, J.; Guillemt, C.J.; Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **203**: 173-179.
- Rutenber, E.; Katzin, B.J.; Ernst, S.; Collins, E.J.; Mlsna, D.; Ready, M.P.; Robertus, J.D. (1991). Crystallographic Refinement of Ricin to 2.5 Å, *Proteins*, **10**: 240–250.
- Ryan, C.A. (1981). Proteinase inhibitors. In: *Biochem. Plants*. **6**: 351-370.
- Ryan, C. (1990). Protease inhibitors age for improving defense against and pathogens. *Annua. Rev. Phytophetol.*, **28**: 425-449.

- Schagger, H.; Aquila, H.; Von Jagow, G. (1987). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**: 201-205.
- Schreuder, H.; Tardif, C.; Trump-Kallmeyer, S.; Soffientini, A.; Sarubbi, E.; Akesson, A.; Bowlin, T.; Yanofsky, S.; Barrett, R.W. (1997). A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist, *Nature*, **386**: 194-200.
- Schmaier, A. H. (2000). Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr. Opin. Hematol.*, **7**: 261-265.
- Shewry, P.R. & Lucas, J.A., (1997). Plant Proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Adv. Bot. Res.*, **26**:135-192.
- Shibata, H.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. (1986). Purification and characterization of proteinase inhibitors from winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus L.*) seeds. *J. Biochem.*, **99**: 1147-1155.
- Silva, J.A.; Macedo, M.L.; Novello J.C.; Marangoni, S. (2001). Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. *J. Prot. Chem.*, **20**: 1-7.
- Siuzdak, G. (1994). The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:11290-11297.
- Smith, D.L. & Zhou, Z. (1990) Strategies for locating disulfide bonds in proteins. *Meth. Enzymol.* **193**: 374-389.
- Song, H.K. & 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, C.A.M. (1995). Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *Phytochemistry*, **39**: 521-525.
- Svendsen, I.; Hejgaard, J.; Mundy, J. (1986). Complete amino acid sequence of α -amilase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res. Commun.*, **51**: 43-50.
- Swindells, M.B. & Thornton, J.M. (1993). A study of structural determinants in the interleukin-1 fold, *Prot. Eng.*, **6**: 711-715.
- Tanaka, A.S.; Sampaio, M.U.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J.C.N.; Oliva, M.L.V.; Fink, E.; Sampaio, C.A.M. (1997). Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. *Biol. Chem.*, **378**: 273-281.
- Tan-Wilson, A.L.; Chen, J.C.; Duggan, M.C.; Chapman, C.; Obach, R.S.; Wilson, K.A. (1987). *J. Agric. Food Chem.* **35**: 974-981.

- Tashiro, M.; Hashino, K.; Shiozaki, M.; Ibuki, F.; Maki, Z. (1987). The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor. *J. Biochem.*, **102**: 297-306.
- Terada, S.; Fujimura, S.; Katayama, H.; Nagasawa, M.; Kimoto, E. (1994). Purification and characterization of two Kunitz family subtilisin inhibitors from seeds of *Canavalia lineata*. *J. Biochem.*, **115**: 392-396.
- Transue, T.R.; Smith, A.K.; Mo, H.; Goldstein, I.J.; Saper, M.A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin, *Nat. Struct. Biol.* **4**: 779–783.
- Troncoso, M.F.; Zolezzi, P.C.; Hellman, U.; Wolfenstein-Todel, C., (2003). A novel trypsin from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **411**: 93-104.
- Vallee, F. Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K. W., Svensson, B., and Haser, R. (1998) Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution, *Structure*. **6**: 649–659.
- Valueva, T.A.; Revina, T.A.; Mosolov, V.V. (1997). Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. *Biochemistry*, **62**: 1367-1374.
- Valueva, T.A.; Revina, T.A.; Mosolov, V.V.; Mentele, R., (2000). Primary structure of potato kunitz-type serine proteinase inhibitor. *Biol. Chem.*, **381**: 1215-1221.
- Voet, D., Voet, G.J. & Pratt, W.C. (2000). *Princípios de Bioquímica*. Editora Artimed – Porto Alegre-RS.
- Weder, J.K.P. & Link, I. (1993). Effect of treatments on legume inhibitor activity against human proteinases. In: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds; Proc. 2nd Int. Workshop Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds (Van der Poel, A.F.B.; Huisman, J. & Saini, H.S. eds.). Wageningen Pers, Wageningen.
- Weeks, C.M., & Miller, R. (1999). The design and implementation of SnB v2.0, *J. Appl. Crystallog.* **32**: 120–124.
- Wilson, K.J. & Chen, J. C. (1983). Amino acids sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified forms appearing during germination. *Plant. Physiol.*, **71**: 341-349.
- Woody, R. W. (1995). Circular dichroism. *Meth. Enzymol.*, **246**: 34-71.
- Wu, C. & Whitaker, J.R. (1990). Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). *J. Agr. Food Chem.* **38**: 1523-1529.
- Wu, H.C. & Lin, J.Y., (1993). The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. *J. Biochem.*, **113**: 258-263.
- Wu, J., & Watson, J.T. (1997). A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins. *Prot. Sci.*, **6**: 391 - 398.

- Xavier-Filho, J. & Campos, F.A.P. (1983). The use of anhydrotrypsin-sepharose for isolation of trypsin inhibitors from *Vigna unguiculata* seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **16**: 11-15.
- Xavier-Filho, J. & Coelho, A. N., (1980). Acid proteinases of *Callosobruchus maculatus* and proteinase inhibitors of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol.*, **65**: 138. Supplement.
- Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P. (1989). Proteinase inhibitors. In *Toxicants of Plant Origins*, ed. P. R. Cheeke, Vol. III. Boca Raton, FL: CRC Press In press.
- Xavier-Filho, J.; Sales, M. P.; Fernandes, K.V. S.; Gomes, V. M. (1996). The resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) is due to the association of variant vicilins (7S storage proteins) to chitinous structures in the insects midgut. *Arq. Biol. Tecnol.*, **39**: 693-699.
- Zhu, X.; Komiya, H.; Chirino, A.; Faham, S.; Fox, G. M.; Arakawa, T.; Hsu, B.T.; Rees, D.C. (1991). Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors, *Science*, **251**: 90-93.
- Yamamoto, M.; Hara, S.; Ikenaka, T. (1983). Amino acid sequences of two inhibitors from winged bean seeds (*Psopocarpus tetragonolobus* (L) DC.). *J. Biochem.*, **94**: 849-863.
- Yang, J.T. (1996). Prediction of protein secondary structure from amino acid sequence. *J. Prot. Chem.*, **15**: 185-191.

VIII. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA DURANTE O DOUTORADO (2000-2004).

01. ATIVIDADES CIENTÍFICAS

TRABALHOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS

1. Silva, J.A.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2001). Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. *J. Protein Chemistry*. **20** (1): 1-7.
2. Krauchenco, S.; Silva, J.A.; Nagem, R.A.; Brandão-Neto, J.R.; Forrer, V.P.; Ferreira, R.; Macedo, M.L.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **57**: 1316-1318.
3. Krauchenco, S.; Nagem, R.A.; Silva, J.A.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. (2004) Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie.*; **86**(3):167-72.
4. Da Silva, M.; Silva, J.A.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Meirelles, N.C. (2004). A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.*; **138**(1):67-74.
5. Silva, J.A.; Gozzo, F.C.; Smolka, M.B.; Macedo, M.L.; Eberlin, M.N.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Primary Structure of Trypsin Inhibitor (TDI-1) from *Copaifera langsdorffii* seeds. The first Sequence protein from Brazilian Flora Determined by 2D Electrophoresis and Mass Spectrometry. (Submitted by Arch Biochem. Biophys., 2004).
6. Silva, J.A.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 65 Anos de história dos inibidores de serinoprotease tipo Kunitz em plantas: aspectos funcionais, estruturais, conformacionais e evolutivos. Implicações no mecanismo de defesa (Submetido para a Revista de Biotecnologia e Ciência, 2004).
7. Silva, J.A.; Macedo, M.L.; Smolka, M.B.; Novello, J.C.; Marangoni, S. The performance of *Callosobruchus maculatus* F. in artificial seeds containing a CTI trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii* Seeds (Submitted by Phytochemistry, 2004).
8. Silva, J.A.; Baldasso, P.A.; Mattioli, M.A.P.; Toyama, M.H.; Fraceto, L.F.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* candida (BvCL): Isolation and biochemical characterization. (Submitted by Plant Science, 2004).
9. Silva, J.A. & Marangoni S., Copaíba contra o caruncho. Sementes da árvore nativa mostram-se fatais para a grande praga da agricultura. Revista Pesquisa FAPESP, Ed 71, Janeiro de 2002.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E RESUMOS PUBLICADOS

1. Da Silva, M.E.F.; Silva, J.A.; Martins, D; Maragoni, S.; Novello, J.C.; Meirelles, N.C. Use of 2D-electrophoresis and MALDI-TOF in the identification of hepatic CYP1a isoformas of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian Freshwater fish. 13th International Conference on Cytochromes p450. Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism, June 29- July 3, 2003. Prague, Czech Republic.
2. Silva-Silva, A.M.; Silva, J.A.; Damico, D.C.S.; Beghini, D.G.; Novello, J.C.; Marangoni S. Molecular Game: An Easy way to learn DNA cloning. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, K-2,1 2003.
3. Silva-Silva A.M.; Silva, J.A.; Smolka, M.B.; Castellari, R.R.; Novello, J.C.; Marangoni S. Protein Profiles and identification of defense proteins of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Phaeosphaeria maydis* fungi. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-99, 2003.
4. Nascimento, J.M.; Da Silva, M.E.F.; Silva, J.A.; Marangoni, S.; Meirelles, N.C., Characterization and partial purification of cytochrome P450 of the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Annelida, Eudrilidae). XXXII

- Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-46, 2003.
5. Da Silva, M.E.F.; Silva, J.A.; Marangoni, S.; Novello J.C.; Meirelles, N.C., A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-47, 2003.
 6. Silva, J.A.; Smolka, M.B.; Ebertin, M.N.; Gozzo, F.M.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangoni S. Primary structure of trypsin inhibitor (TDI) from seeds *Copaifera langsdorffii*. The first sequence protein from brazilian flora determined by mass spectrometry. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-153, 2003.
 7. Oliveira, B. M.; Silva, J.A.; Martins, D.; Mattioli, M.A.P.; Novello, J.C.; Marangoni, S., Comparative study of the trypsin inhibitors from *Lagenaria vulgaris* and *Chenopodium quinoa* seeds. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-81, 2003.
 8. Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Baldasso, P.A.; Pinto, L.M.A.; de Paula, E.; Novello, J.C.; Marangoni, S., Preliminary Liposome encapsulation of *Chenopodium quinoa* seeds lectins with activity against *Xanthomonas*. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20, de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-82 2003.
 9. Gutierrez, C.A.; Silva, J.A.; Silva, E.A.; Sakai, E.; Brunini, O.; Novello, J.C.; Mazzafera, P.; Marangoni, S., Characterization of coffee storage proteins from distinct areas with distinct edafoclimatic conditions. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17-20 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N-30, 2003.
 10. Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Novello, J.C.; Marangoni S. Estudo da atividade da lectina de sementes de *Chenopodium quinoa* (CQLEC) sobre linfócitos e seu encapsulamento em lipossomas, X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 25 E 26 de setembro de 2002.
 11. Oliveira, B.M.; Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Novello, J.C.; Marangoni S. Purificação e caracterização de Inibidores de Tripsina de sementes de *Chenopodium quinoa*. X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 25 E 26 de setembro de 2002.
 12. Jiora, A.P.; Oliveira, B.M.; Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Novello, J.C.; Marangoni S. Purificação e caracterização de Inibidores de Tripsina das sementes de *Cucurbita máxima* (Sapalium). X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 25 E 26 de setembro de 2002.
 13. Kota, D.J.; Silva, J.A.; Novello, J.C.; Marangoni S. Purificação, Caracterização Bioquímica e Funcional de lectinas sementes de *Chenopodium quinoa*. X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 25 E 26 de setembro de 2002.
 14. Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Smolka, M.B.; Baldasso, P.A.; Novello, J.C.; Marangoni S. Molecular Characterization Of Bvcl, A Lectin From *Bauhinia variegata* candida, Using Electrophoresis, Circular Dichroism And Mass Spectrometry Techniques. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18-21 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N38, 2002.
 15. Krauchenco, S.; Silva, J.A.; Nagem, R.P.; Macedo, M.L.R.; Marangoni, S. The X-Ray Structure of a Novel Kunitz Type Trypsin Inhibitor From Seeds of *Copaifera langsdorffii*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18-21 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N80, 2002.
 16. Silva-Silva, A.M.; Silva, J.A.; Mello, G.C.; Baldasso, P.A.; Novello, J.C.; Marangoni, S., Lectins From "Pata de vaca" Plants: A New Tool to Teach Structure and Function of Proteins. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18-21 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, K23, 2002.
 17. Oliveria, B.M.; Silva, J.A.; Mattioli, M.A.P.; Smolka, M.B.; Novello, J.C.; Marangoni S. 2D Electrophoresis and Mass Spectrometry Reveal: Trypsin Inhibitor from *Copaifera langsdorffii* Seeds Belongs to Kunitz Family. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 18-21 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N13, 2002.
 18. Mattioli, M.A.P.; Silva, J.A.; Oliveira, B.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Isolation and Some Properties of a Lectin from *Glycyne. wightii* (soja perene) Seeds. . XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N189, 2001
 19. Baldasso, P.A.; Silva, J.A.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Alpha-Galactoside Binding Lectin from *Bauhinia variegata* candida (Bvcl): Isolation and Biochemical Characterization. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N190, 2001.
 20. Da Silva, M.E.F.; Silva, J.A.; Nascimento, J.M.; Marangoni, S.; Meirelles, N.C., Characterization of Cytochrome P450 of a Freshwater Fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). . XXX Reunião Anual

- da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N179 2001.
21. Ribeiro, D.A.; Ponce-Soto, L.S.; **Silva, J.A.**; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello JC. The Comparative Study With Serine Proteases of Snake Venom from *Bothrops alternatus* and *Bothrops atrox* (Of Peruvian). XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N150, 2001.
 22. Kota, D.J.; **Silva, J.A.**; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S., A Brand New Mannose-Glucose Specific Lectin from *Chenopodium quinoa* Seeds (Chenopodiaceae Family). XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N85, 2001.
 23. Oliveira, B.M.; **Silva, J.A.**; Mattioli, M.A.P.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S., Amino Acid Composition and N-Terminal Sequence of Trypsin Inhibitor from *Lagenaria vulgaris* (Cabaça) Seeds. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N82, 2001.
 24. Krauchenco, S.; **Silva, J.A.**; Nagem, R.P.; Brandão-Neto, J.R.; Forrer, V.P.; Camona e Ferreira, R.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Polikarpov, I., Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of a Kunitz Type Trypsin Inhibitor from Seeds of *Copaifera langsdorffii*. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N48, 2001.
 25. **Silva, J.A.**; Granjeiro, P.A.; Oliveira, B.M.; Macedo, M.L.R.; Aoyama, H.; Marangoni, S., Effect of Amino Acid Modifying Reagents on the Activity of the Trypsin Inhibitor (TDI) from Seeds *Copaifera langsdorffii* and Fluorescence Measurements. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, N28, 2001.
 26. Araújo, D.R.; **Silva, J.A.**; Galembeck, E., Insulin-Leptin Game: A New Approach to teach Hormonal Signalling. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19-22 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, K-14, 2001.
 27. Mattioli, M.A.P.; **Silva, J.A.**; Marangoni, S., Purificação e caracterização de uma lectina (Bvcl) das sementes de *Bauhinia variegata* candida. VII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 19-20 de Setembro, Unicamp, Campinas, SP, Public. em Resumos B118, 2000.
 28. Oliveira, B.M.; **Silva, J.A.**; Marangoni, S., Análise da composição de aminoácidos do inibidor de tripsina LvTI das sementes de cabaça (*Lagenaria vulgaris*). VII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 19-20 de Setembro, Unicamp, Campinas, SP, Public. Em Resumos B117, 2000.
 29. Krauchenco, S.; **Silva, J.A.**; Marangoni, S.; Polikarpov, I. Crystallization and Preliminary Diffraction studies of a trypsin inhibitor extraction from *Copaifera langsdorffii* Seeds. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 27-30 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, pg 148, 2000.
 30. Oliveira, B.M.; **Silva, J.A.**; Mattioli, M.A.P.; Novello, J.C.; Marangoni, S., Isolation and partial characterization of trypsin inhibitor from Cabaça (*Lagenaria Vulgaris*) Seeds XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 27-30 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, pg 136, 2000.
 31. Ribeiro, D.A.; **Silva, J.A.**; Marangoni, S.; Novello, J.C., Purification and Partial Characterizations of a Protease from the *Bothrops Alternatus* Venom. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 27-30 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, pg 135, 2000.
 32. **Silva, J.A.**; Granjeiro, P.A.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C; Aoyama, H.; Marangoni, S. Effect of Urea and Guanidinium Chloride on the Stability of The Tripsin Inhibitor (TDI) from Seeds *Copaifera langsdorffii*. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 27-30 de Maio, Caxambu, MG. Publicado em Resumos, pg 128, 2000.

BOLSAS DE ESTUDOS E PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS

1. FAPESP Proc. N° 2003/06860-0. Projeto de Auxílio pesquisa, intitulado por: Aspectos Estruturais, Funcionais, Conformacionais e Evolutivos do Inibidor de Tripsina de Sementes de *Copaifera langsdorffii*. Coordenado pelo Prof. Dr. Sergio Marangoni, 2004-2005.
2. Bolsa FAPESP Proc. 00/02317-1, Bolsa de Doutorado. No curso de Pós-graduação em Ciências, Área de concentração Bioquímica na sub-área de Bioquímica Vegetal – Proteínas de Sementes, desenvolvendo o

- projeto intitulado “Caracterização da estrutura molecular e estudos físico-químicos de inibidores de sementes de *Copaifera langsdorffii*.”
3. Projeto Auxílio Pesquisa FAEP-Proc. 0686/01. Isolamento e caracterização de inibidores de tripsina das sementes de *Lagenaria vulgaris*. Coordenador: Prof. Dr. Sergio Marangoni, 2002-2003.
 4. Projeto Auxílio Pesquisa da FAEP Proc 2002/1147/01. Estudos de lectinas de Sementes de *Glycine wightii*, sob a coordenação do Prof. Dr. José Camilo Novelo, 2001-2002.
 5. Projeto Ensino da FAEP Proc n. 1155/01. Abordagem visual do ensino de Bioquímica, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni 2001-2002.
 6. Projeto de Auxílio Pesquisa FAEP Proc. n. 0312/99. Isolamento e caracterização Bioquímica de um inibidor de tripsina de sementes de *Copaiba langsdorfi*. Coordenador Prof. Dr. Sergio Marangoni, 1999-2000.

CO-ORIENTAÇÕES DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Carlos Andrade Rivas Gutierrez**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Caracterização e identificação de proteínas de reserva em sementes de café de 3 localidades distintas do estado de São Paulo (Adamantina, Mococa e Campinas)”, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, desde o segundo semestre de 2002 até a presente data.
2. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **José Luiz Rosenberis**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Caracterização das Propriedades Antinutricionais das Proteínas de Reservas (Inibidores de Serinoproteases e Lectinas) em sementes de *Chepodium quinoa*”, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni. Desde o primeiro semestre de 2003 até a presente data.
3. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Marcelo Augusto P. Mattioli**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Caracterização da Estrutura Primária de Lectinas (CqLec) de *Chenopodium quinoa*”, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2002 até a presente data.
4. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Bruno Menezes de Oliveira**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Estudo comparativo da Estrutura Primária de Inibidores de tripsina em Sementes de *Lagenaria vulgaris* e *Chenopodium quinoa*”. Sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni. De julho de 2002 até a presente data.
5. Co-orientou o acadêmico **Júlio César Teixeira Francisco**, no estágio laboratorial no Laboratório de Química de Proteínas, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no projeto intitulado por “Estudo da Interação das subunidades alfa e beta do inibidor de tripsina TDI com a serinoprotease de sementes de *Copaifera langsdorffii*”, sob a coordenação do Prof Dr Sérgio Marangoni no ano de 2002.
6. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Marcelo Augusto P. Mattioli**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Estudo da Atividade Mitogênica da Lectina de Sementes de *Glycine wightii* (GwLec) Livre e Encapsulada em Lipossomos sobre Linfócitos e Fibroblastos”, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2001 a agosto de 2002.
7. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Bruno Menezes de Oliveira**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Purificação e Caracterização de Inibidores de Serinoproteases em Sementes de *Chenopodium quinoa*”, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2001 a agosto de 2002.
8. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Daniel Jiro Kota**, com bolsa de pesquisa SAE-PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Purificação, Caracterização Bioquímica e Funcional de Lectinas em Sementes de *Chenopodium quinoa*”, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2001 a agosto de 2002.
9. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Ana Paula Jiora**, com bolsa de pesquisa SAE-PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por “Purificação e Caracterização de Inibidores de *Cucúrbita máxima* (sapium)”, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2001 a agosto de 2002.

10. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Marcelo Augusto P. Mattioli**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por "Estudos de Lectinas de Sementes de *Glycine wightii*", sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2000 a agosto de 2001.
11. Participou na Co-orientação de Iniciação Científica (IC) de **Bruno Menezes de Oliveira**, com bolsa de pesquisa PIBIq-CNPq, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, com o projeto intitulado por "ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR DE TRIPSINA DAS SEMENTES DE *LAGENARIA VULGARIS*", sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, de julho de 2000 a agosto de 2001.
12. Co-orientou o acadêmico **Marcelo Augusto P. Mattioli** no seu estágio laboratorial no Laboratório de Química de Proteínas, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no desenvolvimento de técnicas de purificação de lectinas em sementes da Família Myrtaceae, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, do início do segundo semestre de 1999 ao primeiro semestre de 2000.
13. Co-orientou o acadêmico **Bruno Menezes de Oliveira** no seu estágio laboratorial no Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, na caracterização bioquímica de um inibidor de baixa massa molecular de sementes da Família Cucurbitaceae, sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio Marangoni, do início do segundo semestre de 1999 ao primeiro semestre de 2000.

02. ATIVIDADES EM ENSINO

1. Participou da Equipe Docente, ministrando a disciplina semestral de **Bioquímica Médica** para alunos do curso de Ciências Biológicas da Modalidade Médica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no primeiro semestre de 2004 sob a coordenação do Prof Dr. José Camillo Novello.
2. Participou da Equipe Docente, confeccionando material didático e aplicando a disciplina semestral de **Bioquímica Médica** BD990 para alunos do curso de Licenciatura de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, ministrada no primeiro semestre de 2004, sob a coordenação do Prof Dr. José Camillo Novello.
3. Participou da Equipe Docente, confeccionando material didático e aplicando a disciplina semestral de **Bioquímica Médica** para alunos do curso de Ciências Biológicas da Modalidade Médica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, ministrada no segundo semestre de 2003, sob a coordenação do Prof Dr. José Camillo Novello.
4. Professor Monitor na disciplina eletiva de graduação "**Bioquímica da Nutrição a Distância**" oferecida a alunos de graduação da UNICAMP, USP e da Escola de Extensão, durante o primeiro semestre de 2003, confeccionando o módulo didático sobre a sinalização de insulina e leptina e sua relação com a obesidade e envelhecimento, bem como desenvolvendo um roteiro para a elaboração de um Software no programa Flash, sob a coordenação do Prof. Dr. Eduardo Galembeck.
5. Participou da Equipe Docente, confeccionando material didático e aplicando a disciplina semestral de **Bioquímica Médica** para alunos do curso de Ciências Biológicas da Modalidade Médica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, ministrado no segundo semestre de 2002, sob a coordenação do Prof Dr. José Camillo Novello.
6. Participou como Professor Colaborador na equipe Docente, auxiliando a confecção do material didático e ministrando aulas na disciplina semestral de **Bioquímica Básica** para o curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, no segundo semestre de 2002, sob a coordenação do Prof Dr. Sérgio Marangoni.
7. Professor na disciplina eletiva **Bioquímica dos Hormônios** oferecida pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com carga horária de 30 horas, no período de 05 a 09 de fevereiro de 2001.
8. Professor Monitor na disciplina de **Bioquímica I**, (BB-115) do Curso de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, participando da equipe docente que ministrou aulas de Proteínas e Enzimas no Bloco A Célula, coordenada pelo Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, durante o primeiro semestre de 2001.
9. Professor Monitor na disciplina eletiva de graduação **Bioquímica da Nutrição a Distância** oferecida a alunos de graduação da UNICAMP e USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Eduardo Galembeck, durante segundo semestre de 2001.
10. Professor (Programa de Estágio Docente - PED) na disciplina de **Bioquímica Básica** (BB280B) do Curso de Ciências Biológicas no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, ministrando aulas e participando da equipe docente coordenada pelo Prof. Dr. Sérgio Marangoni durante o segundo semestre

- de 2001.
11. Professor (Programa de Estágio Docente - PED) na disciplina de **Bioquímica Básica** (BB280B) do Curso de Ciências Biológicas no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. ministrando aulas e participando da equipe docente coordenada pelo Prof. Dr. Sérgio Marangoni durante o segundo semestre de 2000.
 12. Professor Monitor na disciplina de **Bioquímica I**, (BB-115) do Curso de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, participando da equipe docente, coordenada pelo Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, durante o primeiro semestre de 2000.
 13. Professor Monitor na disciplina eletiva de graduação **Bioquímica da Nutrição a Distância** oferecida a alunos de graduação da UNICAMP e USP durante o segundo semestre de 2000.

03. PALESTRAS, AULAS ESPECIAIS MINISTRADAS E ACESSORIA.

01. Palestra intitulada por Estrutura e Propriedades dos aminoácidos no dia 23/09/2003 na Disciplina "Tópicos Avançados em Fisiologia" do Curso de pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.
02. Palestra intitulada por Estrutura de Proteínas no dia 30/09/2003 na Disciplina "Tópicos Avançados em Fisiologia" do Curso de pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.
03. Palestra intitulada por Modificações Pós-traducionais de Proteínas: Glicosilação e Fosforilação no dia 07/10/2003 na Disciplina "Tópicos Avançados em Fisiologia" do Curso de pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.
04. Palestra intitulada por Integração catabólica e anabólica nos dias 09/10/2003 e 29/10/2003 na Disciplina "Bioquímica Básica" do Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da UNICAMP.
05. Palestra intitulada por "Bem vindo ao Mundo da Bioquímica" para alunos do ensino médio, em colaboração com a Empresa Junior Alpha-Bio do Instituto de Biologia da Unicamp, no dia 25/06/2003.
06. Atuou como Assessor Científico no VI CAEB – Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia, realizado na Universidade Estadual de Campinas, avaliando os trabalhos de Iniciação Científica na Área de Bioquímica e Biologia Molecular, de 06 a 10 de outubro de 2003.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*S. Krauchenco,^a J. A. Silva,^b
R. A. P. Nagem,^a J. R. Brandão
Neto,^a V. P. Forrer,^a R. Carmona
e Ferreira,^a M. L. R. Macedo,^c
J. C. Novello,^b S. Marangoni^b and
I. Polikarpov^{a*}^aLaboratório Nacional de Luz Síncrotron,
Campinas, SP, Brazil, ^bDepartamento de
Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp,
Campinas, SP, Brazil, and ^cDepartamento de
Ciências Naturais, CEUL, Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, MS, Brazil

Correspondence e-mail: igor@lnls.br

A novel trypsin inhibitor isolated from seeds of *Copaifera langsdorffii* was purified to homogeneity and crystallized. Crystals suitable for X-ray analysis were grown using the hanging-drop vapour-diffusion method at 291 K in sodium acetate buffer at pH values near 4.3 using PEG 4000 as precipitant. The crystals presented symmetry compatible with the space group $P4_12_12$ or $P4_32_12$, with unit-cell parameters $a = b = 58.71$, $c = 93.75$ Å, and diffracted to 1.83 Å resolution at the synchrotron source.

Received 15 February 2001

Accepted 3 July 2001

1. Introduction

Proteinase inhibitors may be defined as proteins capable of strongly inhibiting hydrolytic enzymes both *in vitro* and *in vivo* by forming stoichiometric and stable complexes (Breddam *et al.*, 1991; Bode & Huber, 1991). They are present in multiple forms in numerous tissues and fluids of plants, animals and microorganisms (Laskowisk & Kato, 1980; Richardson, 1991). Of the inhibitors presents in plants, many are active against exogenous rather than endogenous enzymes, suggesting that they play a role in plant defence, conferring a broad spectrum of resistance to pests and pathogens (Bowles, 1990; Broadway & Duffey, 1986, 1988; Ryan, 1990; Christeller *et al.*, 1992; Shewry & Lucas, 1997; Vigers *et al.*, 1991).

Animal tests and medical experiments have shown that proteinase inhibitors of certain types are anticarcinogenic (Yavelow *et al.*, 1983; Troll *et al.*, 1987; Troll & Kennedy, 1989; Kennedy, 1994; Liener, 1995). The anticarcinogenic properties include the ability to reduce oxygen-radical formation (Yavelow *et al.*, 1982; Frenkel *et al.*, 1987), to suppress the growth of chemical-induced colon and anal gland tumours in rats (Billings *et al.*, 1990), breast tumours in rats and humans (Troll *et al.*, 1980; Tamir *et al.*, 1990) and lung tumours in mice (Witschi & Kennedy, 1989), to suppress chemical- or radiation-induced cell transformation (Billings *et al.*, 1987, 1989) and to reduce spontaneous chromosome abnormality (Afzal *et al.*, 1989). Epidemiological studies suggest that human populations which are known to have high concentration of certain proteinase inhibitors, mainly Bowman–Birk and Kunitz families, in their diet have lower rates of colon, breast, prostate and skin cancers (Correa, 1981; Kennedy, 1998; Chen *et al.*, 1992).

Proteinase inhibitors are divided according to the class of the enzyme they inhibit. Sequencing and X-ray crystallographic studies have shown that the inhibitors of serine proteinases can be further subdivided into several families. The major criteria for establishing a family are extensive homology among its members, topological relationships between the disulfide bridges and location of the reactive site (Laskowisk & Kato, 1980; Weder, 1992; Ryan, 1990; Bowles, 1990; Bode & Huber, 1992; Birk, 1985, 1994). Of the many types of trypsin inhibitors, the most important are the Kunitz and the Bowman–Birk proteinase inhibitor families. The Bowman–Birk inhibitors have molecular weights of 8–10 kDa and usually possess seven disulfide bridges. The Kunitz-type inhibitors usually have a molecular weight of about 20 kDa and only two disulfide bridges.

An unusual proteinase inhibitor forming a heterodimer of two non-covalently linked polypeptide chains with molecular weights of 11 and 9 kDa was extracted from the seeds of the *C. langsdorffii* tree (Leguminosae, Caesalpinioideae). Here, we present the results of purification, N-terminal characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of this inhibitor.

2. Experimental

2.1. Protein extraction and purification

The whole seeds were ground in an electric mill and the heavily pigmented fragments of the tegument were separated by suspension in chloroform [1:3(*w/v*)]. A crude inhibitor preparation was obtained by extraction with 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.6 [1:4(*w/v*)] for 4 h at 277 K. Centrifugation of the extracts was performed at 10 000 rev min⁻¹ at 277 K for 30 min and was followed by

ammonium sulfate precipitation. The precipitate was dialyzed for 24 h at 277 K against distilled water and freeze-dried. All the following purification steps were performed at room temperature.

The precipitate was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and applied to a Sepharose DEAE column (1.6 × 19 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0. After 200 ml of buffer elution, a column was eluted with a concentration gradient of sodium chloride from 0 to 0.5 M. The flow rate was 30 ml h⁻¹, the collection

volume was 3.0 ml and the protein absorption was monitored at 280 nm. The inhibitory fraction (DI) was dialyzed and freeze-dried. This fraction was applied to a Sepharose 4-B-anhydrotrypsin affinity column using 50 mM Tris buffer pH 8.0. The column was washed with the same buffer and the inhibitors were eluted with 1 mM HCl in 500 mM NaCl. The biological activity of the inhibitor was detected using bovine trypsin and *N*- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) as described by Erlanger *et al.* (1961). The purity of the inhibitor was checked by SDS-PAGE (Fig. 1).

2.2. N-terminal characterization

N-terminal sequencing was performed by Edman degradation (Edman & Begg, 1967). 40 nmol of purified inhibitor reduced with 1 M DTT was transferred to a PVDF membrane and applied on the automatic sequencer Procise 491 (Applied Biosystems). Two different N-terminal sequences have been derived, one of which, corresponding to 11 kDa chain, shows a high

degree of similarity with the members of the Kunitz family of inhibitors (Table 1). No homology was found, however, for the 9 kDa chain N-terminal amino-acid sequence.

2.3. Crystallization and X-ray data collection

All attempts to crystallize the separate polypeptide chains of the protein were unsuccessful. The intact protein inhibitor, however, was readily crystallizable. The crystals of the whole inhibitor used for data collection were grown by hanging-drop vapour diffusion at 291 K in 0.1 M sodium acetate buffer at a pH near 4.3 using PEG 4000 (20–25%) as a precipitant (Fig. 2). Drops consisted of equal volumes of protein at a concentration of 10 mg ml⁻¹ and reservoir solution. Small crystals grew after 4 d. The presence of both chains in the crystallized material was confirmed by SDS-PAGE gel (Fig. 1).

X-ray diffraction data was collected from crystals mounted in a rayon loop, immersed for 30 s in a cryocooling solution (20%

ethylene glycol mixed with the mother liquor) and flash-cooled to 80 K in a cold nitrogen stream (Fig. 3). Data collection was performed at the Protein Crystallography beamline (Polikarpov, Oliva *et al.*, 1997; Polikarpov, Perles *et al.*, 1997) at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (Campinas, SP, Brazil) using a MAR345 image plate. Data was autoindexed and integrated with the program DENZO (Otwinowski, 1993). Scaling and merging of data were performed with the program SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

3. Results and discussion

The results from SDS-PAGE (Fig. 1) and N-terminal amino-acid sequencing (Table 1) indicate that the inhibitor under study has two chains, with molecular weights of approximately 11 and 9 kDa, that are non-covalently linked together to form a heterodimer of approximately 20 kDa. These two domains are separated under reducing conditions with 0.1 M DTT and have different N-terminal amino-acid composition.

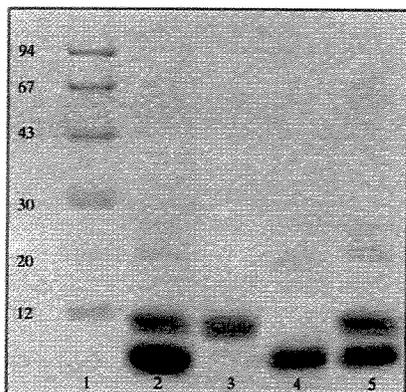


Figure 1

SDS-PAGE using a 16.5% tricine gel. Lane 1 shows the molecular-weight standards: phosphorylase (MW = 94 kDa), albumin (MW = 66 kDa), egg albumin (MW = 43 kDa), carbonic anhydrase (MW = 30 kDa), pancreas trypsin inhibitor (MW = 20 kDa) and cytochrome (MW = 12 kDa). Lane 2 shows the inhibitor extracted from *C. langsdorffii* seeds and reduced with 0.1 M DTT. Lanes 3 and 4 show the two non-covalently bound parts of the molecule separated with 0.1 M DTT and purified by HPLC using a reverse-phase column. Lane 5 shows the inhibitor from dissolved crystal.



Figure 2

Crystals of *C. langsdorffii* protease inhibitor. The crystals were grown by the hanging-drop vapour-diffusion method at 291 K in 0.1 M sodium acetate buffer at pH values near 4 using PEG 4000 (20–25%) as precipitant.

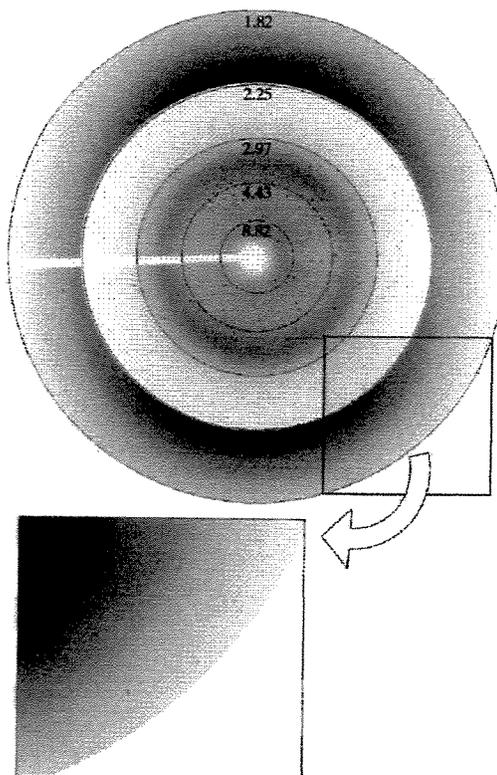


Figure 3

Diffraction pattern of the crystal. The outer area of the diffraction image (between resolution rings of 2.25 and 1.82 Å) is shown about four times more saturated than the inner part of the image. The close-up of the outer part of the image depicts reflections extending to a maximum resolution of 1.83 Å.

Table 1

N-terminal amino-acid sequences of the two inhibitor polypeptide chains separated with 0.1 M DTT and isolated by purification on a HPLC reverse-phase column.

The table also shows part of the soybean trypsin inhibitor primary structure, which presents 50% identity with chain I of the *C. langsdorffii* trypsin inhibitor. No significant homology was found for the chain II. *, identical; †, similar; ‡, different.

Inhibitor chains separated	N-terminal sequence
TI chain I (11 kDa)	RLVDTNGKPIENDGAEEYILPAVR -:***:*. .*. .*****:*
STI (residues 2–23)	VLDTDGHPNLRN-GGTYIILPAIR
TI chain II (9 kDa)	WQLPSVTGVNPKVSFAFGGPF

An X-ray diffraction data set (Table 2) was collected from a flash-frozen crystal measuring $0.1 \times 0.07 \times 0.03$ mm using synchrotron radiation with a wavelength of 1.38 Å. Diffraction pattern showed tetragonal Laue symmetry and systematic absences indicated that the crystal is compatible with the space group $P4_12_12$ or $P4_32_12$. The small size of the crystal limited diffraction intensities and the final resolution range. In order to optimize the X-ray diffraction data collection, the synchrotron-radiation wavelength was changed to 1.535 Å (Polikarpov, Teplyakov *et al.*, 1997). A second data set was collected from a different single crystal and evaluated. Its maximum resolution range extended to 1.83 Å. The crystal belonged to the same tetragonal space group. The unit-cell parameters were determined to be $a = b = 58.71$, $c = 93.75$ Å.

The calculated cell volume is 3.25×10^5 Å³. Assuming the molecular weight of the protein to be 20 kDa, the calculated Matthews coefficient (V_M ; Matthews, 1968) was 2.03 Å³ Da⁻¹, indicating the presence of one molecule in the asymmetric unit. A number of crystallographic models of Kunitz-type trypsin inhibitors available in Protein Data Bank were tested as search models for molecular replacement. However, all attempts to find molecular-replacement solution were unsuccessful. A systematic search for heavy-atom derivatives is currently under way. The quick cryoderivatization procedure recently

Table 2

Data collection and processing statistics.

Statistical values for the highest resolution shell are shown in parentheses

Space group	$P4_3(1)2_12$
Unit-cell dimensions (Å)	
$a = b$	58.86
c	93.83
Wavelength (Å)	1.535
Crystal-to-detector distance (mm)	100
Resolution range (Å)	25.3–1.83 (1.87–1.83)
No. of reflections	123604
No. of unique reflections	15024
Redundancy	4.0
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	23.6 (3.3)
Mosaicity (°)	0.5
Multiplicity	8.2 (5.4)
No. of images collected	100
Oscillation per image (°)	1.3
Completeness (%)	99.7 (97.6)
R_{merge} (%)	8.9 (50.8)

$$\dagger R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} |I - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} I}$$

introduced by Dauter *et al.* (2000) will be applied.

Financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) via projects 99/03387-4 and 00/02317-1 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) is acknowledged.

References

- Afzal, V., Wiencke, J. K. & Wolff, S. (1989). *Carcinogenesis*, **10**, 1193–1196.
- Billings, P. C., Morrow, A. R., Ryan, C. A. & Kennedy, A. R. (1989). *Carcinogenesis*, **10**, 687–691.
- Billings, P. C., Newberne, P. M. & Kennedy, A. R. (1990). *Carcinogenesis*, **11**, 1083–1086.
- Billings, P. C., St Clair, W., Ryan, C. A. & Kennedy, A. R. (1987). *Carcinogenesis*, **8**, 809–812.
- Birk, Y. (1985). *Int. J. Pept. Protein Res.* **25**, 113–131.
- Birk, Y. (1994). *Arch. Latinoam. Nutr.* **44**, 26S–30S.
- Bode, W. & Huber, R. (1991). *Biomed. Biochim. Acta*, **50**, 437–446.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). *Eur. J. Biochem.* **204**, 433–451.
- Bowles, D. I. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873–907.
- Breddam, K., Widmer, F. & Meldal, M. (1991). *Int. J. Pept. Protein Res.* **37**, 153–160.
- Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1986). *J. Insect Physiol.* **8**, 673–680.
- Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1988). *J. Insect Physiol.* **34**(12), 1111–1117.
- Chen, P., Rose, J., Love, R., Wei, C. H. & Wang, B. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 1990–1994.
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P. & Burgess, E. P. J. (1992). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 735–746.
- Correa, P. (1981). *Cancer Res.* **41**, 3685–3690.
- Dauter, Z., Dauter, M. & Rajashankar, K. R. (2000). *Acta Cryst. D56*, 232–237.
- Edman, P. & Begg, G. (1967). *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- Erlanger, B. F., Kolowsky, N. & Cohen, N. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271–278.
- Flavin, D. F. (1982). *Vet. Hum. Toxicol.* **24**, 25–28.
- Frenkel, K., Chrzan, K., Ryan, C. A., Wiesner, R. & Troll, W. (1987). *Carcinogenesis*, **8**, 1207–1212.
- Kennedy, A. R. (1994). *Cancer Res.* **54**, 1999S–2005S.
- Kennedy, A. R. (1998). *Pharmacol. Ther.* **78**, 167–209.
- Laskowisk, M. Jr & Kato, I. (1980). *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593–626.
- Liener, I. E. (1995). *J. Nutr.* **125**, 744S–759S.
- Lorenzi, H. (1992). *Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Nativas do Brasil*. Editora Platarum LTDA.
- Matthews, B. M. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Otwinowski, Z. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 56–62. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R., Arruda, P., Leite, A. & Craievich, A. (1997). *Nucl. Instrum. Methods A*, **405**, 159–164.
- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. & Craievich, A. (1997). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.
- Polikarpov, I., Teplyakov, A. & Oliva, G. (1997). *Acta Cryst. D53*, 734–737.
- Pusztai, A. (1989). *Toxicants of Plant Origin*, Vol. 2, edited by P. R. Sheek, pp. 29–71. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Richardson, M. (1991). *Methods Plant. Biochem.* **5**, 259–305.
- Ryan, C. A. (1990). *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 425–449.
- Shewry, P. R. & Lucas, J. A. (1997). *Adv. Bot. Res.* **26**, 135–192.
- Tamir, S., Kadner, S., Katz, J. & Finlay, T. H. (1990). *Endocrinology*, **127**, 1319–1328.
- Troll, W. & Kennedy, A. R. (1989). *Cancer Res.* **49**, 499–502.
- Troll, W., Wiesner, R. & Frenkel, K. (1987). *Adv. Cancer Res.* **49**, 265–283.
- Troll, W., Wiesner, R., Shellabarger, C. J., Holtzman, S. & Stone, J. P. (1980). *Carcinogenesis*, **1**, 469–472.
- Vigers, A. J., Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. (1991). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 315–323.
- Weder, J. K. P. (1992). *Annu. Rev. Biochem.* **16**, 239–279.
- Witschi, H. & Kennedy, A. R. (1989). *Carcinogenesis*, **10**, 2275–2277.
- Yavelow, J., Finlay, T. H., Kennedy, A. R. & Troll, W. (1983). *Cancer Res.* **43**, 2454–2459.
- Yavelow, J., Gidlund, M. & Troll, W. (1982). *Carcinogenesis*, **3**, 135–138.



Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*

Sandra Krauchenco ^a, Ronaldo A.P. Nagem ^a, José A. da Silva ^b,
Sérgio Marangoni ^b, Igor Polikarpov ^{a,*}

^a Grupo de Cristalografia, Department of Physics and Informatics, Institute of Physics (IFSC), University of Sao Paulo (USP),
Avenue Trabalhador Saocarlene, 400, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^b Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Received 27 November 2003; accepted 12 March 2004

Available online 10 April 2004

Abstract

The crystallographic structure of a novel trypsin inhibitor (CTI) from *Copaifera langsdorffii* is reported. The structure was solved by MIRAS procedure and refined to a crystallographic residual of 17.3% ($R_{\text{free}} = 20.3\%$) at 1.8 Å resolution. Two isomorphous derivatives were obtained by quick cryo-soaking approach. CTI is the first structure of a member of Kunitz (STI) family formed by two noncovalently bound polypeptide chains and only one disulfide bridge. A standard Kunitz-type inhibitor has a single polypeptide chain and two disulfide bridges. Structural features granting CTI high inhibitory activity are discussed.
© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Kunitz-type trypsin inhibitor; Quick cryo-soaking; X-ray structure; β -Trefoil fold; *Copaifera langsdorffii*

1. Introduction

Proteinase inhibitors are proteins capable to inhibit the activity of hydrolytic enzymes by forming stable stoichiometric complexes [1]. Proteinase inhibitors are widely distributed among living organisms and their major physiological function appears to be to prevent unwanted proteolysis [2]. Plant inhibitors confer a broad spectrum of resistance to pests and pathogens by inhibiting the action of the bacterial proteinases [3]. Serine proteinase inhibitors of Bowman-Birk and Kunitz (STI) families possess anticarcinogenic properties [4]. These include the ability to decrease oxygen radical

formation, suppress the growth of chemically-induced colon, breast and lung tumors and to reduce spontaneous chromosomal abnormalities [5,6].

There are 18 canonical families of serine proteinase inhibitors. The Kunitz family is divided into two subfamilies: (i) Kunitz STI-like, with molecular mass of about 20 kDa and two disulfide bridges; (ii) Kunitz BPTI-like, with molecular mass of about 6.5 kDa and three disulfide bridges [7].

An unusual trypsin inhibitor (CTI) was isolated from seeds of *Copaifera langsdorffii* tree (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) [8]. We report the three-dimensional structure of CTI solved by MIRAS using the quick cryo-soaking procedure for derivatization [9,10]. To the best of our knowledge, this is the first report of a crystallographic structure of an inhibitor of the Kunitz (STI) family with two noncovalently bound polypeptide chains and a single disulfide bridge. The structural basis of a high inhibitory activity of CTI is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Crystallization and derivatives preparation

CTI was purified and crystallized following earlier described protocols [8,11]. The derivatives were prepared by

Abbreviations: CTI, trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*; DrTI, Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds; ESI, electrospray ionization mass spectrometry; ETI, trypsin inhibitor from *Erythrina caffra*; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MIRAS, multiple isomorphous replacement with anomalous scattering; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; r.m.s., root mean square; SIRAS, single isomorphous replacement with anomalous scattering; STI, trypsin inhibitor from soybean *Glycine max*; WBA, major albumin from winged bean *Psophocarpus tetragonolobus*; WCI, chymotrypsin inhibitor from winged bean *P. tetragonolobus*.

* Corresponding author. Tel.: +55-16-273-8088; fax: +55-16-273-9881.

E-mail address: ipolikarpov@ifsc.usp.br (I. Polikarpov).

quick cryo-soaking method [9,10] using sodium iodide and cesium chloride in 0.5 and 1.0 M concentrations, respectively.

2.2. Data collection and processing

The native and derivative data sets were collected on the protein crystallography beamline [12] at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (Campinas, SP, Brazil), using a MAR345 image plate. The synchrotron-radiation wavelength was set to 1.54 Å to maximize both X-ray flux and the anomalous signal [13]. The diffraction data were collected with a high multiplicity and then auto-indexed and integrated with the program DENZO [14] (Table 1). The quality of each data set and the presence of the anomalous signal of cesium and iodine atoms were monitored following $|\Delta F^{\text{ANO}}|/F$ and $|\Delta F^{\text{ANO}}|/\sigma(\Delta F^{\text{ANO}})$ ratios as a function of resolution.

2.3. Phasing

Seven cesium sites were located by direct methods. Scaled intensities were input into SnB 2.1 package [15], and normalized anomalous differences E (where

$E = \Delta F^{\text{ANO}}/\sqrt{(\Delta F^{\text{ANO}})^2}$ for 151) were calculated with DREAR [16]. The bimodal distribution of the R_{min} histogram was used to identify the correct solution. The obtained heavy-atom positions were initially refined with the CNS package [17] using anomalous and isomorphous differences, and were then used as an input to SHARP [18] for phase calculations. Cs-SIRAS derived phases were submitted to density modification protocols. The resulting phases were used to calculate anomalous and isomorphous difference Fourier maps. In addition to seven cesium cations, nine iodine anions were found in the asymmetric unit of I derivative. All 16 heavy-atom sites were included in MIRAS phase calculation with SHARP. An initial electron density map was finally obtained after density modification with SOLOMON [19].

2.4. Model building and refinement

The MIRAS electron density map calculated with SHARP/SOLOMON [18,19] was used as an input to ARP/wARP [20] to build a hybrid model of the inhibitor. A total of 20 automatic building cycles were performed, tracing up to 92% of the structure. The constructed model consisted of 148 residues distributed in six chains with a few main-chain discontinuities between them. Discontinuities were

Table 1

Details of crystallographic data collection and refinement statistics. Values for the highest resolution shell are shown in parentheses

	Native	I-derivative	Cs-derivative
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters (Å)	$a = b = 58.71$ $c = 93.75$	$a = b = 58.42$ $c = 93.91$	$a = b = 58.33$ $c = 93.80$
Resolution range (Å)	25.3 – 1.83 (1.87 – 1.83)	25.3 – 1.92 (1.96 – 1.92)	22.9 – 2.00 (2.05 – 2.00)
Number of observations	123 604	2 85 176	3 12 518
Number of unique observations ^a	15 024	23 500	20 853
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	23.6 (3.3)	33.7 (13.9)	34.1 (13.1)
Mosaicity (°)	0.57	0.42	0.53
Multiplicity ^a	8.2 (5.4)	12.1 (12.0)	15.0 (14.7)
Data collected (°)	130	292	360
Completeness (%)	99.7 (97.6)	99.5 (93.9)	99.8 (99.5)
R_{merge} (%) ^b	8.9 (50.8)	7.3 (17.0)	9.3 (23.8)
Refinement statistics			
Number of protein atoms	1449		
Number of waters molecules	183		
Number of reflections used in refinement (working/test data sets)	13 661/1363		
R_{factor} (%) ^c	17.3		
R_{free} (%) ^d	20.3		
Average B_{factor}			
Main-chain (Å ²)	20.1		
Side-chains (Å ²)	22.4		
Waters (Å ²)	39.4		
R.m.s. deviations from ideal geometry			
Bonds (Å)	0.019		
Bonds angles (°)	1.6		

^a Multiplicities of derivative data sets were calculated with Friedel-related reflections treated separately. Multiplicity of the native data set was calculated with Friedel-related reflections treated as equivalent.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} |I - \langle I \rangle| / \sum_{hkl} I$.

^c $R_{\text{factor}} = \sum (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^d R_{free} was calculated using 1363 reflections randomly selected in a test data set.

filled with water molecules clearly showing amino acid residues structures. The model was further improved using the program O [21]. The amino acid residues identity was deduced from the experimental electron density maps. The presence of cysteines and methionines residues was checked using anomalous difference Fourier maps (ΔF^{ANO} , $\phi_{\text{calc}} - 90^\circ$). Two methionines, A72 and A90, and two half-cystines, A40 and A84, forming the only disulfide bridge of CTI, were found. Furthermore, CTI does not contain free cysteines.

Simultaneously and independently, the amino acids sequence was determined using 2D-PAGE, MALDI-TOF and ESI mass spectrometry (S. Marangoni, personal communication). Comparison of the amino acid sequence and the putative sequence deduced from the electron density maps showed that three-fourths of the total sequence was correctly identified from visual inspection of the maps.

The model was refined with CNS package [17] and REFMAC5 [19] using standard protocols. The final crystallographic R_{factor} is 17.3% for 13 661 unique reflections in the working data set between 25.3 and 1.83 Å and R_{free} is 20.3% for 1363 unique reflections in the test data set within the same resolution range.

3. Results

3.1. Quality of the refined model

The data in Table 1 show a well refined structure with excellent stereochemistry. The CTI model is very well defined by electron density. All main-chain dihedral angles are within the allowed regions of the Ramachandran plot [22]. The loop regions, including the reactive loop, display elevated B-values as compared to the core of the molecule.

3.2. Overall architecture

CTI is all beta protein with a β -trefoil fold (Fig. 1a) formed by 12 antiparallels β -strands with long interconnecting loops [23,24]. The protein could be divided into three approximately equal subdomains related by a pseudo-threefold axis roughly parallel to the barrel axis of the trefoil (Fig. 1b). Each of the subdomains consists of about 60 amino acids, half of which form four β -strands (β_m , $m=1,2,3,4$) and the other half form the loops (L^m) that connect them. Each subdomain is structurally organized as $L_n^1\beta_n^1L_n^2\beta_n^2L_n^3\beta_n^3L_n^4\beta_n^4$. The superposition performed using the 30 topologically equivalent C^α atoms that compose the β -strands of each repetition unit result in the r.m.s. deviation of 1.5 Å between subdomains T_1 (residues A1–A60) and T_2 (residues A61–B120); 1.9 Å between subdomains T_1 and T_3 (residues B121–B167) and 1.7 Å between subdomains T_2 and T_3 . Although the subdomains do not demonstrate any discernible amino acid similarity, it was suggested that the β -trefoil fold arose from a homotrimer-forming progenitor repeat, which underwent successive gene duplication events [25].

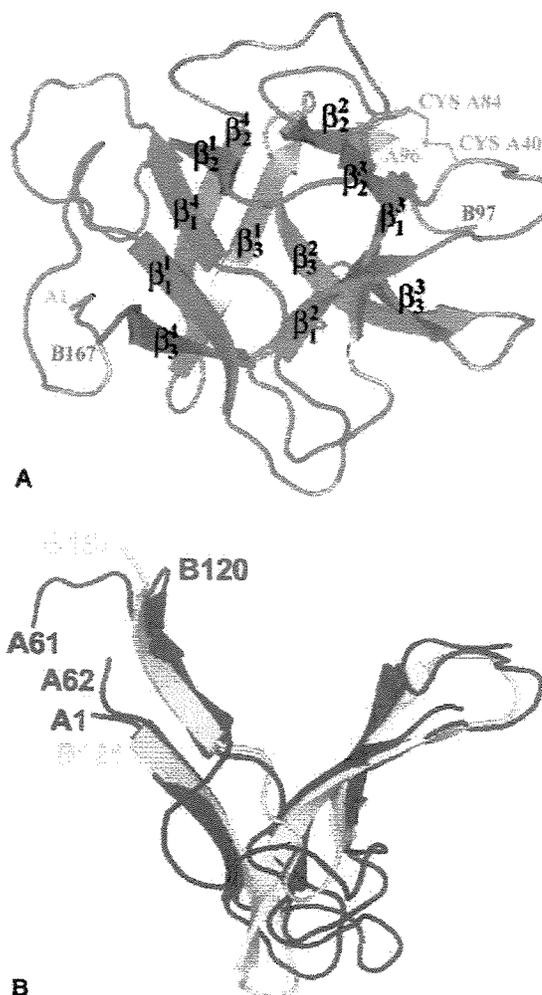


Fig. 1. (a) The overall β -trefoil fold of CTI. The chain A (residues A1–A96) painted in orange and the chain B (residues B97–B167) painted in blue. A single disulfide bridge between residues A40 and A84 is shown in green. All β -strands are numbered. (b) Superposition of the subdomains T_1 – T_3 , painted in blue, red and yellow, respectively.

3.3. CTI is composed of two polypeptide chains

The CTI crystallographic model consists of two noncovalently bound polypeptide chains; A (residues A1–A96) and B (residues B97–B167) (Fig. 1). The break between chains A and B is clearly defined by electron density. The existence of the two noncovalently bound polypeptide chains explains the presence of two bands in the SDS-PAGE gel in denaturing conditions [11]. The N-terminus of the 11 kDa band shows high homology with the members of Kunitz (STI) family, but not the N-terminus 9 kDa band that led to erroneous identification of CTI as two separate inhibitors [8]. It also explains why the attempts to crystallize each part of the inhibitor separately were unsuccessful.

3.4. There is only one disulfide bridge in CTI

One of the distinct features of the Kunitz (STI) family is the presence of two disulfide bridges that are conserved in almost all members of the family. In contrast, CTI contains only one disulfide bridge located between the residues A40 and A84. The existence of a single disulfide bridge in the structure of CTI was confirmed by anomalous difference Fourier maps (results not shown).

Amino acid sequence comparisons of CTI with homologous proteins performed by BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) reveal that the first disulfide bond is strictly conserved in all active protein inhibitors. It is located between the end of the β -strand of T2 repeat and the beginning of the first β -strand of T3 repeat. This disulfide bridge fastens the reactive site loop and contributes to the maintenance of the canonical conformation necessary to the inhibitory activity.

The second disulfide bond, absent in CTI, is conserved in the majority of the Kunitz-type inhibitors. However, there are several Kunitz-type inhibitors with either none or two disulfide bonds in the corresponding region of the polypeptide chain. These observations indicate that the second disulfide bond appears not to be essential for inhibitory activity. Moreover, biochemical studies have demonstrated that STI retains the inhibitory activity after the reduction of the second disulfide bridge but it becomes inactive in its fully reduced state [26]. Reduction of two disulfide bonds of ETI markedly decreases its inhibitory activity [27]. These facts corroborate with the hypothesis that the presence of the first disulfide bond is essential for the inhibitory activity whereas the presence of a second disulfide bond might be not.

3.5. The reactive loop

The reactive site loop of CTI is located in the chain A and is formed by the residues Phe59–Lys60–Ala61–Ser62–Pro63–Arg64–Ser65–Lys66–Tyr67–Ile68–Ser69 (from P6 to P5' position; Fig. 2a, b). Arg64 occupies P1 position. CTI reactive loop adopts canonical conformation similar to one of the standard Kunitz-type inhibitors like STI [28], ETI [29] and WCI [30].

3.6. Comparison with Kunitz (STI) family members

The three-dimensional structure of CTI exhibits the same structural fold that was found for other Kunitz (STI) family members. Most of the deviations in the conformation of their polypeptide chains are confined to the surface loop regions.

ETI is the Kunitz (STI) family member that presents the highest sequence identity, 31%, with CTI. The r.m.s. deviation between 153 superimposed C α atoms of their polypeptide chains is 1.57 Å. STI and WCI have a sequence identity with CTI of 21% and 23% and the r.m.s. deviations of 1.15 Å (for 147 C α atoms) and 1.51 Å (for 156 C α atoms), respectively. Although CTI reactive loop adopts a conformation

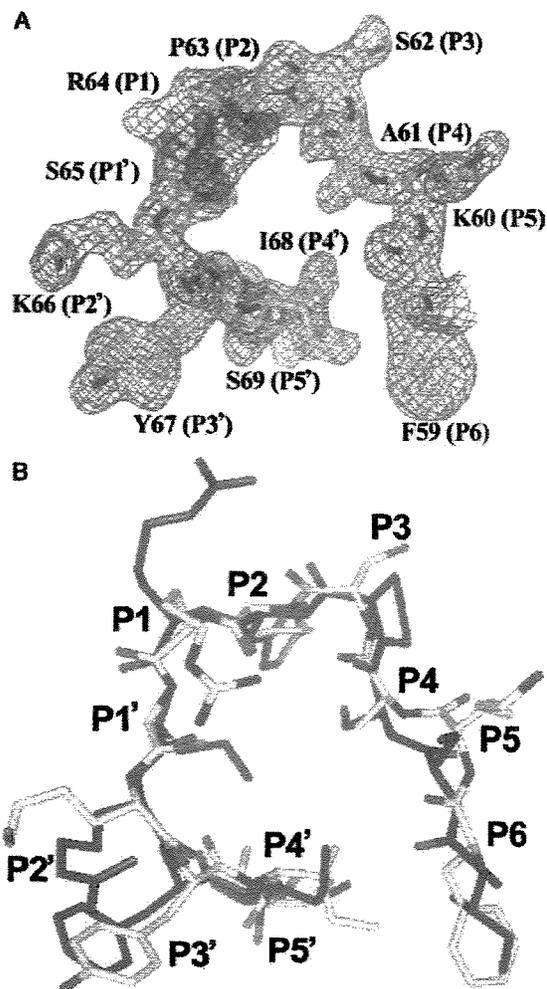


Fig. 2. (a) The CTI reactive site loop (residues PheA59–SerA69) superimposed with the final ($2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$, ϕ_{calc}) electron density map contoured at 1.2σ (given as a blue mesh). (b) The superposition of CTI and a standard Kunitz type trypsin inhibitor, STI reactive loops (in yellow and red, respectively).

very similar to the canonical, the global comparison shows that the sequential and structural agreement is better within STI, ETI and WCI group, than between these proteins and CTI. STI has a sequence identity of 38% with ETI, with a r.m.s. deviation of 1.21 Å for 149 C α atoms, and of 40% with WCI, with a r.m.s. deviation of 1.38 Å for 151 C α atoms superimposed; ETI and WCI have the best agreement with a sequence identity of 53% and a r.m.s. deviation of 0.93 Å for 158 C α atoms superimposed.

DrTI is a new member of the Kunitz (STI) family which has an extra amino acid residue in the reactive loop between residues P1 and P2 [31]. Although this insertion distorts the reactive loop causing it to lose the canonical conformation, a r.m.s. deviation of the superposition of CTI and DrTI is 1.57 Å for 146 C α atoms superimposed. Amino acid sequence identity of these two proteins is 25%.

The largest deviations are observed in comparison of CTI with another family member, WBA [32], which has 19% of sequence identity with CTI. The r.m.s. deviation between WBA and CTI is 1.69 Å for 137 best superimposed C α atoms.

4. Discussion

Trypsin is capable of cleaving peptides at nearly every lysine-X and arginine-X position (with the exception of proline at X). Therefore, potentially about 5–10% of the peptide bonds in proteins are susceptible to its proteolytic attack. If this is so, why is it unable to efficiently cleave trypsin inhibitors?

Structural and biochemical studies show that its attempts to cleave inhibitors result in a formation of trypsin-inhibitor complex, in which the inhibitor reactive loop binds to the enzyme active site in a “perfect substrate” conformation and is cleaved, but not released from the active site of the enzyme. Binding of a cleaved inhibitor in the pocket of enzyme is tight and oriented; this prevents acyl-enzyme hydrolysis and favors the inverse reaction with the relegation of the leaving group, that dramatically slows down (up to 10⁷ times) the whole reaction [33]. The canonical conformation of the reactive loop, thus, is very important for a suitable positioning and an effective adaptation to a proteolytic enzyme active site.

Like the canonical inhibitors from the Kunitz (STI) family, CTI has a high inhibitory activity against trypsin ($K_i = 1.2$ nM) [8]. In order to understand the structural basis of this phenomenon, we superimposed the structure of CTI with the structures of STI (PDB ID 1AVU) and STI complexed with porcine trypsin (PDB ID 1AVW). These comparisons demonstrate that CTI reaction loop adopts canonical conformation very similar to the one of STI (Fig. 2b). In addition, most of the trypsin-inhibitor contacts are conserved in the putative CTI:trypsin complex (results not shown).

It is tempting to suggest that the high inhibitory activity of CTI against trypsin is related to a conservation of the canonical conformation of its reactive loop. Furthermore, potential negative effects of a break in a polypeptide chain and the lack of one disulfide bridge seems to be offset by a structural integrity of the protein molecule locked in a canonical conformation by a dense network of hydrogen bonds.

5. Protein data bank

Atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) for release upon publication. The PDB entry corresponding to the structure is 1R8O.

Acknowledgements

We thank Professor Richard C. Garrat, Valéria Peyrl Forrer, Renata Carmona e Ferreira and José Ribeiro Brandão

Neto for their scientific assistance. Financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 99/03387-4, 99/04497-8 and 00/02317-1) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) are acknowledged.

References

- [1] W. Bode, R. Huber, Proteinase–protein inhibitor interaction, *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991) 437–446.
- [2] M. Laskowsky Jr, I. Kato, Protein inhibitors of proteinases, *Annu. Rev. Biochem* 49 (1980) 593–626.
- [3] R.M. Broadway, S.S. Duffey, The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors, *J. Insect. Physiol* 34 (1988) 1111–1117.
- [4] J. Yavelow, T.H. Finlay, A.R. Kennedy, W. Troll, Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen, *Cancer Res* 43 (1983) 2454s–2459s.
- [5] P.C. Billings, P.M. Newberne, A.R. Kennedy, Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1083–1086.
- [6] P.C. Billings, A.R. Morrow, C.A. Ryan, A.R. Kennedy, Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by carboxypeptidase inhibitor I and inhibitor II from potatoes, *Carcinogenesis* 10 (1989) 687–691.
- [7] A. Wlodawer, J. Deisenhofer, R. Huber, Comparison of two highly refined structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Biol* 193 (1987) 145–156.
- [8] J.A. Silva, M.L.R. Macedo, J.C. Novello, S. Marangoni, Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds, *J. Prot. Chem* 20 (2001) 1–7.
- [9] Z. Dauter, M. Dauter, K.R. Rajashankar, Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides, *Acta Crystallogr D* 56 (2000) 232–237.
- [10] R.A.P. Nagem, Z. Dauter, I. Polikarpov, Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers, *Acta Crystallogr D* 57 (2001) 996–1002.
- [11] S. Krauchenco, J.A. Silva, R.A.P. Nagem, J.R. Brandão Neto, V.P. Forrer, R. Carmona e Ferreira, M.L.R. Macedo, J.C. Novello, S. Marangoni, I. Polikarpov, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*, *Acta Crystallogr D* 57 (2001) 1316–1318.
- [12] I. Polikarpov, L.A. Perles, R.T. de Oliveira, G. Oliva, E.E. Castellano, R. Garrat, A. Craievich, Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory, *J. Synchrotron Rad* 5 (1998) 72–76.
- [13] I. Polikarpov, A. Teplyakov, G. Oliva, The ultimate wavelength for protein crystallography? *Acta Crystallogr D* 53 (1997) 734–737.
- [14] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol* 276 (1997) 307–326.
- [15] C.M. Weeks, R. Miller, The design and implementation of SnB v2.0, *J. Appl. Crystallogr* 32 (1999) 120–124.
- [16] R.H. Blessing, G.D. Smith, Difference structure factor normalization for heavy-atom or anomalous-scattering substructure determinations, *J. Appl. Crystallogr* 32 (1999) 664–670.
- [17] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr D* 54 (1998) 905–921.
- [18] E. de La Fortelle, G. Bricogne, Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods, *Methods Enzymol* 276 (1997) 472–494.

- [19] Collaborative Computational Project, Number 4, the CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr D50* (1994) 760–763.
- [20] A. Perrakis, T.K. Sixma, K.S. Wilson, V.S. Lamzin, wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models, *Acta Crystallogr D53* (1997) 448–455.
- [21] T.A. Jones, M. Bergdoll, M. Kjeldgaard, in: C. Bugg, S. Ealick (Eds.), *Crystallographic and Modelling Methods in Molecular Design*, Springer-Verlag Press, 1990, pp. 189–195.
- [22] G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *Adv. Protein Chem* 23 (1968) 283–437.
- [23] A.G. Murzin, A.M. Lesk, C. Chothia, Beta-trefoil fold, *J. Mol. Biol* 223 (1992) 531–543.
- [24] A.D. McLachlan, Three-fold structural pattern in the soybean trypsin inhibitor (Kunitz), *J. Mol. Biol* 133 (1979) 557–563.
- [25] D. Mukhopadhyay, The molecular evolutionary history of a winged bean alpha-chymotrypsin inhibitor and modelling of its mutations through structural analyses, *J. Mol. Evol* 50 (2000) 214–223.
- [26] F.P. DiBella, I.E. Liener, Soybean trypsin inhibitor: cleavage and identification of a disulfide bridge not essential for activity, *J. Biol. Chem* 244 (1969) 2824–2829.
- [27] K. Lehle, A. Wrba, R. Jaenicke, Erythrina trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide groups, *J. Mol. Biol* 239 (1994) 276–284.
- [28] H.K. Song, S.W. Suh, 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 (1998) 347–363.
- [29] S. Onesti, P. Brick, D.M. Blow, Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds, *J. Mol. Biol* 217 (1990) 153–176.
- [30] S. Ravichandran, U. Sen, C. Chakrabarti, J.K. Dattagupta, Cryocrystallography of a Kunitz-type serine protease inhibitor: the 90 K structure of a winged bean chymotrypsin inhibitor (WCI) at 2.13 Å resolution, *Acta Crystallogr D55* (1999) 1814–1821.
- [31] S. Krauchenco, S.C. Pando, S. Marangoni, I. Polikarpov, Crystal structure of the Kunitz (STI) type inhibitor from *Delonix regia* seeds, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 312 (2003) 1303–1308.
- [32] A.J. McCoy, A.A. Kortt, The 1.8 Å crystal structure of winged bean albumin 1, the major albumin from *Psophocarpus tetragonolobus* (*L.*) *DC*, *J. Mol. Biol* 269 (1997) 881–891.
- [33] E.S. Radisky, D.E. Koshland Jr, A clogged gutter mechanism for protease inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10316–10321.