



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Fernanda Leonel Silva

**Interação do inibidor de proteases BTCl com tripsina,
quimotripsina e proteassoma**

**Brasília - DF
1º/2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Fernanda Leonel Silva

**Interação do inibidor de proteases BTCl com tripsina,
quimotripsina e proteassoma**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharelado em Química.

**Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto dos Santos Politi
Co-Orientador(a): Prof^a Dra. Sonia Maria de Freitas**

**Brasília - DF
1º/2019**

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, em especial à minha mãe, que é uma mulher incrivelmente forte e batalhadora que sempre apoiou as minhas escolhas e acreditou em mim.

À minha coorientadora, prof^a Dr^a. Sonia Maria de Freitas, pela oportunidade de trabalhar e fazer parte do seu grupo de pesquisa. Um grande exemplo de mulher que sempre se mostrou muito inteligente e disposta a passar esse conhecimento.

Ao professor Dr. Aisel Valle Garay, que me ajudou muito, principalmente, na última fase desse trabalho. Um agradecimento especial a você professor, por ser esta pessoa maravilhosa, sempre disposto a ajudar a todos que lhe rodeiam, sendo um exemplo de personalidade.

Ao meu orientador Dr. José Roberto dos Santos Politi, por sempre se disponibilizar a me orientar, tanto neste trabalho quanto no laboratório computacional de química.

Aos meus amigos, em especial a Rayanne Poletti, minha melhor amiga, que sempre foi e será um grande exemplo de pessoa para mim.

Aos amigos da graduação, principalmente a Beatriz Costa Guedes, amiga que quero manter para a vida inteira e que sempre me ajudou nos quesitos acadêmicos e pessoais.

Aos amigos do laboratório de Biofísica Molecular que fizeram meus dias no laboratório serem mais prazerosos e divertidos.

Ao meu namorado, João Felipe Guimarães Peixoto, pela paciência, carinho e compreensão nos últimos meses.

A todos que fizeram parte da minha formação, não só acadêmica, mas também pessoal.

Muito obrigada!

Sumário

I.Introdução.....	6
II.Revisão bibliográfica.....	8
III.Métodos e materiais.....	16
III.1. Purificação do BTCI.....	16
III.2. Análise da atividade inibitória do BTCI contra tripsina e quimotripsina por espectroscopia de Ultra-violeta e visível (UV-vis).....	17
III.3. Análise da atividade inibitória do BTCI contra tripsina por espectroscopia de emissão de fluorescência.....	18
III.4. Expressão e Purificação do proteassoma (PTS20S).....	19
III.4.1.Purificação do proteassoma 20S de levedura.....	19
III.4.2. Análise da pureza do P20S.....	20
III.4.3. Análise do tamanho e estado oligomérico do P20S.....	20
III.4.4. Determinação da concentração de PTS20S.....	21
III.5.Interação e atividade inibitória do PTS20S pelo BTCI.....	22
III.5.1. Ensaio de inibição da atividade peptidase do PTS20S por espectroscopia de fluorescência.....	22
IV.Resultados e discussão.....	23
IV.1. Purificação do BTC.....	23
IV.2. Ensaio da atividade inibitória do BTCI contra tripsina e quimotripsina.....	24
IV.2.1. Análise da atividade inibitória do BTCI por espectroscopia de ultravioleta e visível (Uv-vis).....	24
IV.2.2. Análise da atividade inibitória do BTCI sobre tripsina por fluorescência.....	27
IV.3. Purificação proteassoma 20S de levedura.....	29
IV.4. Ensaio de inibição do proteassoma 20S pelo BTCI por fluorescência.....	33

V.Conclusões.....	36
VII.Bibliografia.....	37

I. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre inibidores de protease estão sendo de bastante interesse devido a sua vasta aplicação no âmbito biológico, como no tratamento de câncer de mama, próstata, oral ou faringiano [1]. Alguns dos inibidores de protease são encontrados em plantas. Dentre esses, os mais abundantes e extensivamente caracterizados, são aqueles presentes em sementes de leguminosas (*leguminosae*). Nas plantas, estes inibidores atuam como agentes protetores contra patógenos e insetos, devido às propriedades funcionais em inibir proteases que são fundamentais no desenvolvimento destes organismos. Nas sementes, apresentam proteção contra perigos ambientais, durante a fase de germinação [2].

O inibidor de proteases denominado BTCl (do inglês Black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor) é uma proteína isolada e purificada das sementes da *Vigna Unguiculata* (c.v. Seridó) [3]. Esta classificado como membro da família dos inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI – Bowman-Birk inhibitors). Membros desta família apresentam sítios reativos distintos e independentes contra proteases, tripsina e/ou quimotripsina, sendo conhecidos como inibidores bifuncionais, do tipo *Double-headed*. Geralmente, o sítio reativo para tripsina é representado por um resíduo lisina (Lys-26, no caso do BTCl) e o sítio reativo para quimotripsina é representado por uma fenilalanina (Phe-53, no caso do BTCl) [4], tirosina ou leucina.

O BTCl, assim como outros inibidores de protease, apresenta potencial para aplicação biotecnológica em várias linhas do conhecimento, principalmente na área farmacológica e no controle biológico de pragas em plantações. Estas propriedades em potencial são atribuídas à capacidade do BTCl em atuar como inibidor de proteases que são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação celular, ciclo celular, desenvolvimento de larvas de insetos e crescimento de organismos, de forma geral. Dentre estes efeitos, destacam-se as atividades do BTCl como agente anticarcinogênico, ações no aumento da natriurese induzida por guanilina e promover resposta funcional renal em ratos, como um agente potenciador molecular de bradicinina e propriedades como inseticida [5-10].

Este inibidor tem sido estudado desde a década de 60 até os dias atuais, correspondendo a mais de 45 anos de estudos dedicados à purificação, caracterização bioquímica, físico-química, estrutural e funcional desta molécula, de forma livre e em complexo com proteases. Estes estudos foram inicialmente desenvolvidos pelo grupo de professores do Laboratório de Biofísica da UnB, sob a supervisão do saudoso Prof. Emérito da UnB, Manuel Mateus Ventura, até meados de 1996. Desde 1991, a Profa Sonia Maria de Freitas, coorientadora deste TCC, tem desenvolvido vários trabalhos envolvendo este inibidor, principalmente sob o ponto de vista estrutural e funcional.

Devido à variedade de ação biológica e funcional deste inibidor, vários trabalhos têm sido apresentados e publicados visando, no futuro, utilizar esta molécula, bem como peptídeos derivados desta, no controle biológico de pragas e na terapia contra o câncer. A seguir, apresentaremos, de forma cronológica, os vários trabalhos que foram publicados sobre inibidores da família BBI e, em particular, do inibidor de proteases BTC1.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em meados das décadas de 30 e 50, pesquisas sobre isolamento e purificação dos inibidores de tripsina foram mais enfatizadas. Kunitz iniciou um estudo em que se isolava inibidores de tripsina de pâncreas bovino e soja [11-12]. Durante esse tempo, também sucederam-se estudos oriundos dos pesquisadores Bowman e Birk, onde eles constataram a inibição de caseína (origem do leite) pela tripsina a partir de adições de frações de feijão branco e soja [13]. Estes estudos estavam indiretamente conectados, pois ambos abordavam temas sobre a correlação da presença de compostos proteolíticos isoláveis presentes em leguminosas. Entretanto, existe uma diferença durante a metodologia de purificação, onde os da família de Kunitz são extraídos por água e precipitados com etanol, enquanto para Bowman extraía com álcool e precipitava com acetona [14]. Posteriormente, essa diferença metodológica foi explicada devido à presença de duas frações inibitórias no mesmo extrato [15].

A partir desse momento, Birk isolou e caracterizou amostras de inibidores pela primeira vez [16] em frações de leguminosas, constatando que esta era distinta daquela estudada por Kunitz, tanto que esta fração apresentou atividade para tripsina como também uma atividade ainda maior para quimotripsina. Em 1972, Odani completou os estudos anteriormente apontados por Bowman, Birk e Kunitz determinando a seqüência de aminoácidos do extrato protéico e concluindo que a estrutura estudada apresentava duas regiões homólogas e distintas para a inibição de tripsina e quimotripsina [17].

Conforme os estudos eram feitos, mais características e propriedades físico-químicas eram encontradas para diversos inibidores de protease oriundos de sementes de vegetais e que era possível fazer uma ligação com aquelas informações vindas dos trabalhos de Bowman, Birk e Odani. Entretanto, haviam discrepâncias em relação à massa molecular desses inibidores [18-19]. Em 1969, Frettali trabalhando com sementes de soja, constatou a formação de complexos entre as moléculas que podiam ser na forma monoméricas, diméricas e triméricas, quando solúveis em álcool [20]. Então, todas as informações de Birk, Haynes, Feeney e Frattali sobre as espécies estudadas possibilitaram concluir que existiam similaridades entre elas, tais como compostos proteolíticos extraídos de leguminosas, atividade inibitória

tanto para tripsina como quimotripsina e formação de oligômeros, embora os métodos de extração tenham sido diferentes. Por exemplo, Birk utilizou coluna de CM-Celulose e os outros utilizaram DEAE-celulose [21].

No Brasil, o trabalho pioneiro foi realizado por Ventura e Xavier-Filho (1966), no qual purificaram e caracterizaram uma proteína que inibia tripsina e quimotripsina retiradas de sementes de feijão [3]. A purificação deste inibidor é baseada em uma extração com ácido tricloroacético (TCA) e precipitado com sulfato de amônio, seguida de uma cromatografia do tipo troca iônica em uma coluna de DEAE-celulose. Ao fazer uma primeira cromatografia, obtém-se dois picos no cromatograma, um ativo apenas contra tripsina e outro contra as duas enzimas, tripsina e α -quimotripsina. Realizando uma recromatografia de troca iônica, o inibidor denominado Black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inibidor (BTCI) foi purificado [22].

BTCI é uma proteína isolada e purificada das sementes da *Vigna Unguiculata* (c.v. Seridó) [3]. A massa molecular foi primeiramente reportada com 17.100 Da, com utilização de método, por aproximação, de equilíbrio de sedimentação [3], sendo que esta massa molecular, determinada por filtração em gel (cromatografia de exclusão molecular), reduz para 13.300 até 12.800 Da [24]. Posteriormente, essa massa molecular foi estimada por pressão osmótica e o valor obtido foi abaixo de 10.700 Da. Essas discrepâncias quanto ao valor de sua massa, foi depois explicada, utilizando a técnica de espalhamento de luz (do inglês light scattering) [24], pela detecção de unidades moleculares em processo de auto associação, podendo ser monomérica, dimérica e trimérica. Em meio a tantas investigações sobre o BTCI, foi obtido, enfim, sua composição e sequência de 83 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 9,1 kDa [3], na sua forma monomérica. Esta molécula é formada por dois domínios, sendo um deles constituído por três fitas beta, duas das quais dão origem a um arranjo secundário da forma folha beta antiparalela, e a terceira gera outra folha beta antiparalela com a fita beta do domínio simétrico adjacente, que origina a uma forma secundária de interdomínio [24]. Outra característica importante da composição do BTCI, é a ocorrência de ligações dissulfeto devido a 14 resíduos de cisteína que estão diretamente associadas à formação e estabilidade das folhas betas. Essas ligações C-S-S-C promovem uma estabilidade singular à molécula quando ela é submetida a

condições extremas, tais como mudanças de pH e alterações de temperatura. O BTCI apresenta aminoácidos hidrofóbicos expostos ao solvente, característica vista nos inibidores da família de BBI [25]. Estes aminoácidos, Phe⁶⁷, Tyr⁶⁹ e His⁴³, que apresentam estruturas aromáticas, são partes responsáveis pela oligomerização da molécula [4]. A estrutura 3D do BTCI está apresentada nas figuras 1 e 2.



Figura 1 - Representação da estrutura 3D do BTCI, evidenciando dois subdomínios, um contendo o sítio reativo para quimotripsina (fita Beta em azul com o resíduo reativo Phe53) e outro subdomínio contendo o sítio reativo para tripsina (fita beta em rosa com o resíduo Lys26). Em amarelo, estão representadas as regiões N e C terminal e o núcleo estrutural organizado por ligações dissulfeto, duas das quais estão indicadas por setas na figura 2 abaixo. Imagem adaptada [4; 24]

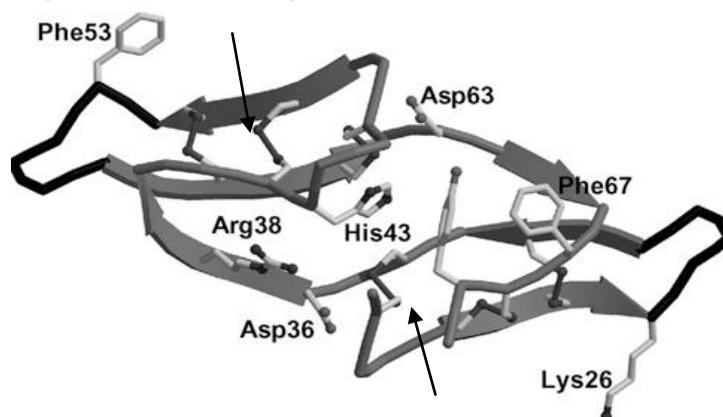


Figura 2 – Representação 3D do BTCI evidenciando as ligações dissulfeto, resíduos P1 (Lys26 e Phe53, sítios reativos para tripsina e quimotripsina, respectivamente) nos subdomínios 1 e 2 e resíduos estabilizantes da região intersubdominal (Asp36, Arg38 e His43, *clusters* de cadeia carregada enterradas, Asp63 exposta e carregada e Phe67 e His43 resíduos aromáticos altamente conservados, posicionados em uma geometria ortogonal).[24]

Os primeiros estudos termodinâmicos e físico-químicos do BTCl interagindo com tripsina foram realizados por Ventura *et al*, na década de 80 [26]. O método utilizado era baseado em titulação com quantidades crescentes de inibidor e detecção da atividade inibitória da tripsina por espectroscopia. A partir destes estudos, foi determinada a proporção de inibidor e enzima de 1:1 (Figura 3), bem como estimados os parâmetros termodinâmicos da reação, como variação da energia livre de Gibbs, variação de entropia e entalpia. Com essas informações, concluiu-se que o processo de inibição de tripsina utilizando o BTCl é uma reação do tipo endotérmico e espontâneo. A estrutura do complexo está apresentada na figura 4.

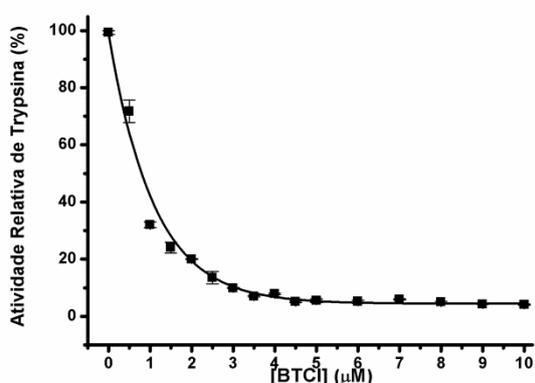


Figura 3 - Atividade inibitória do BTCl contra a tripsina, em concentrações crescentes de BTCl [27]

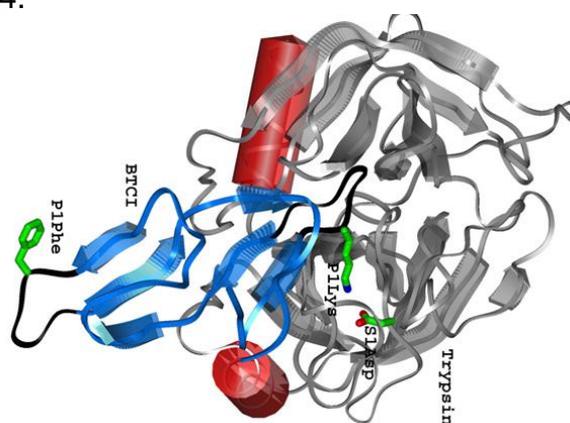


Figura 4 - Complexo BTCl (azul) e tripsina (cinza). Os sítios reativos do BTCl estão representados em verde, Phe e Lys, para quimotripsina e tripsina, respectivamente. A Lys ocupa o bolsão S1 da tripsina, interagindo com o Asp. [24]

Anos mais tarde, foram determinados os parâmetros termodinâmicos da interação do BTCl com a quimotripsina. Os ensaios foram realizados por Freitas *et al* [27] que utilizou métodos espectroscópico e microcalorimetria de mistura isotérmica. Este estudo foi realizado seguindo três protocolos, um semelhante ao que foi realizado por Ventura em 1985 (Figura 5), outro que utilizou uma técnica baseada em polarização de fluorescência e um último baseado na técnica de microcalorimetria de mistura isotérmica. As informações obtidas com este estudo convergiram para resultados semelhantes aos obtidos para a tripsina, sendo a mesma relação estequiométrica ou proporção reacional

1:1 de BTCI e quimotripsina, uma reação do tipo endotérmico e espontâneo. A figura do complexo BTCI-quimotripsina está apresentada na figura 6.

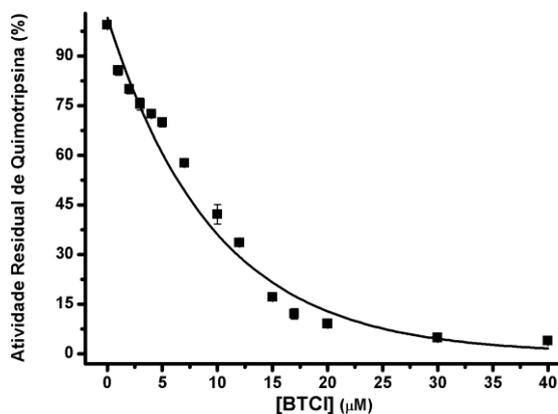


Figura 5. Atividade inibitória do BTCI contra a quimotripsina, em concentrações crescentes de BTCI [26]

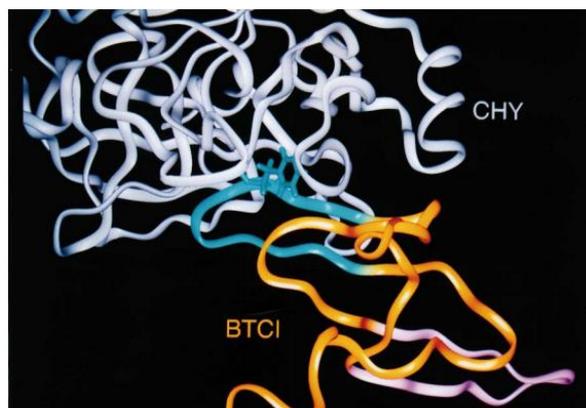


Figura 6 – Complexo do BTCI (azul, laranja e rosa) com quimotripsina (cinza). Sítio reativo para quimotripsina (Phe⁵³), em azul, ocupa o bolsão catalítico da quimotripsina. [4]

Um ponto importante a ser descrito é o mecanismo envolvido na interação do BTCI com essas enzimas. Sabe-se que a quimotripsina e a tripsina são serinoproteases e seus sítios catalíticos reacionais envolvem a participação de uma serina (Ser). Esta Ser, em modelos apresentados por Ventura *et al* [26] e Freitas *et al* [27], funciona como um nucleófilo que ataca o carbono da carbonila da ligação peptídica, causando uma espécie de catálise covalente formando um intermediário ligado a enzima.

Tanto para a tripsina quanto para a quimotripsina, o centro catalítico é formado pelo Asp102, His57 e a Ser195 (numeração da estrutura da quimotripsina). Estes três resíduos formam ligações de hidrogênio entre si, o que propicia o revezamento de cargas na molécula e reduz o pKa da serina, causando uma hiperpolarização da sua ligação OH, formando o nucleófilo desejado. Por comparação aos modelos já reportados para o mecanismo das serinoproteases, a reação ocorre em duas etapas, uma acilação (formando uma acil-enzima) e depois uma desacilação juntamente com água (Figura 7). O sítio reativo da proteína, Phe53 e Lys26 para a quimotripsina e tripsina, respectivamente no BTCI, entram em uma cavidade da enzima onde se encontra o centro catalítico [28].

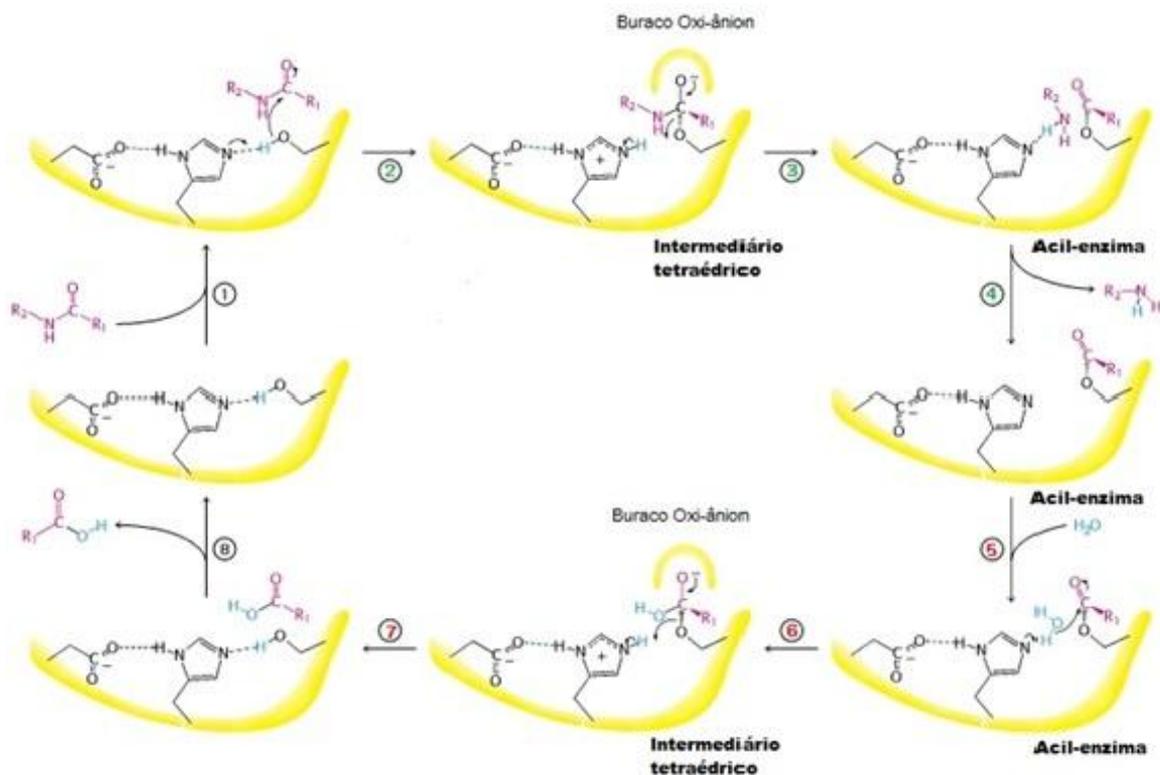


Figura 7 – Representação para o mecanismo catalítico da quimotripsina. No passo 3 ocorre a acilação, formando uma acil-enzima, já na parte 5, a água entra em contato com esta parte da molécula e, na parte 7, ocorre a reação de desacilação [28].

O que difere o mecanismo da quimotripsina e tripsina são as especificidades por substratos. No caso da quimotripsina, uma Phe ocupa um espaço hidrofóbico e é posicionado para permitir o acesso da Ser da enzima próxima à ligação peptídica, envolvendo esta Phe. Na tripsina, a Lys interage por interação eletrostática com o Asp189 da protease, posicionando de forma semelhante o sítio reativo Lys26 próximo à tríade catalítica (Figura 8) [31].

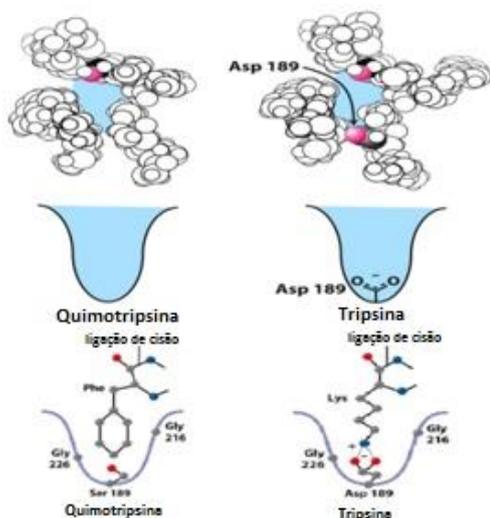


Figura 8 – Imagem comparativa quanto à especificidade e envolvimento dos sítios reativos da quimotripsina e da tripsina em seus respectivos bolsões catalíticos. [31]

Estas proteases tripsina e quimotripsina estão associadas à degradação de proteínas e estão presentes em vários tipos de organismos, desempenhando uma série de funções, como controle do ciclo celular, processamento de proteínas de interesse vital, coagulação sanguínea e fibrinólise, na resposta imune, na liberação de hormônios protéicos, a partir de moléculas precursoras, no transporte de proteínas secretoras pela membrana, no controle da digestão de proteínas, na fertilização e no processo de montagem de estruturas macromoleculares, como as fibras de colágeno e alguns vírus [29-30].

Uma proteína de destaque nas células de organismos superiores, plantas e outros é o complexo proteico denominado proteassoma. Este é um complexo enzimático multicatalítico expressado no núcleo e no citoplasma de todas as células eucarióticas. No oligômero proteico 20S do proteassoma, encontram-se subunidades com atividades catalíticas do tipo protease. Especificamente, três tipos de subunidades com atividades proteolíticas residem no oligômero, sendo elas do tipo caspase-like, tripsina-like e quimotripsina-like, encontradas nas subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, respectivamente. Essas atividades são fundamentais para a degradação de proteínas que são dobradas de forma errada ou proteínas sem função na célula. O proteassoma 20S apresenta uma conformação semelhante a um cilindro composta por 4 anéis heptaméricos de subunidades α e β , 2 anéis β centrais e 2 anéis α nas extremidades[32].

O BTCl, por apresentar atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina, também foi capaz de inibir a atividade proteolítica do proteassoma 20S [33], pois este apresenta subunidades que têm atividade como estas enzimas. Esta inibição tem sido atribuída à atividade anticarcinogênica do BTCl, contra células de câncer de mama. Estudos feitos com células tumorais da linhagem MCF-7 mostraram que essas células foram impedidas de proliferar devido à presença do BTCl. O mais interessante constatado foi que o inibidor não afetou a população células normais epiteliais mamaria do tipo MCF-10A [7]. Entender o mecanismo de morte dessas células tumorais é de suma importância. Sabe-se que uma das principais vias de morte celular envolve o processo de degradação protéica, exercida pela via de ubiquitação e posterior degradação do proteassoma.

Este complexo protéico, o proteassoma 20S, é objeto de estudo do presente projeto, onde foi avaliado a interação desta molécula, sobre suas subunidades catalíticas, com o BTCl.

III. Métodos e materiais

III.1. Purificação do BTC1

A purificação do BTC1 foi realizada baseada no protocolo descrito por Ventura et al [3] e esse processo é feito seguindo os seguintes passos:

As sementes do feijão são descascadas e trituradas para se obter um pó fino. A 1 kg deste pó são adicionados 4 L de água destilada e 400 µL de fenilmetilsulfonilfluor (PMSF) 200 mM, com o objetivo de inibir a ação de proteases existentes nas sementes. Então, este extrato foi deixado em agitação por 12 horas dentro da câmara fria a aproximadamente 4 °C. Logo após, o extrato foi submetido a uma agitação máxima em um liquidificador, com o intuito de causar um maior grau de homogeneização à amostra. A agitação foi realizada por 15 minutos, sendo este processo dividido em 3 etapas de 5 minutos, com intervalo de 5 minutos entre elas, para evitar o aquecimento da amostra.

Em seguida, o extrato foi filtrado em uma malha de algodão, onde se separa o bagaço. O procedimento de homogeneização no liquidificador foi repetido com mais 1 L de água destilada para maior proveito do extrato, sendo o bagaço resultante descartado posteriormente. A suspensão obtida foi submetida ao processo de precipitação por adição sucessiva e constante de ácido tricloroacético (TCA) a 2,5% por 1 hora, sob agitação em um agitador magnético. Posteriormente, o extrato foi deixado em agitação por mais 1 hora e filtrado logo após com um filtro de papel.

O extrato resultante foi submetido à centrifugação por 30 minutos à 4 °C e 8.000 x g. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio 70% (peso/volume) para precipitação de proteínas. Este extrato foi deixado em agitação por mais 1 hora a fim de otimizar a precipitação e, posteriormente, centrifugado por 30 minutos à 4 °C e 8.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com água destilada. Logo após, a suspensão proteica foi colocada em saquinhos de diálise com espessura da malha para reter proteínas de até 7 kDa e dialisado contra água destilada. Este processo foi realizado repetidamente, com trocas de aproximadamente 10 vezes em intervalos de 1 hora e 30 minutos.

Este material obtido, extrato bruto (EB), por conter variedade de proteínas do feijão, incluindo o BTC1, foi submetido à cromatografia de troca iônica com resina DEAE-celulose com dimensões 3 cm de diâmetro e 20 cm de altura para purificação do inibidor. A amostra de EB foi preparada em tampão fosfato de sódio 100mM e pH 7,3 para uma concentração final de 10 mM. A coluna foi previamente ativada com as seguintes lavagens consecutivas: água destilada, HCl 0,2 M, água destilada, NaOH 0,2 M, água destilada, tampão de eluição 10x e tampão de eluição 1X. A coluna foi posteriormente lavada com 750 mL de tampão fosfato de sódio a 10 mM e pH 7,3. Logo após, eluiu-se o BTC1 com a aplicação de um gradiente linear de NaCl 0-0,8 M, sendo este aplicado com um fluxo de 3 mL por minuto. Esta eluição foi acompanhada pela leitura concomitante da absorbância em 280 nm, utilizando o aparelho AKTA Prime (*GE Healthcare*, EUA). A amostra contendo o BTC1 foi por fim coletada e submetida ao mesmo processo de diálise realizado anteriormente.

III.2. Análise da atividade inibitória do BTC1 contra tripsina e quimotripsina por espectroscopia de Ultra-violeta e visível (UV-vis)

O ensaio de inibição específico para tripsina foi feito utilizando a tripsina diluída em solução de HCl 1 mM para uma concentração final de 32,6 nM e seu substrato sintético específico ($N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride – BAPNA) que foi dissolvido em 500 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e 500 μ L de tampão de ensaio para a tripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8.2) para obter uma concentração final de 200 μ g/mL. Concentrações crescentes de BTC1 0-5 μ M foram dissolvidas em tampão de ensaio e, em seguida, incubadas com 3 μ L de tripsina por 15 minutos a temperatura ambiente em placa de 96 poços para um volume de ensaio de 200 μ L. Após esse tempo de incubação, 88 μ L de substrato foram adicionados às soluções anteriores e imediatamente realizou as medidas da absorbância no comprimento de onda de 410 nm de cada poço em relação ao tempo usando um espectrofotômetro de placa *M2e spectrophotometer* (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, USA). O ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio de inibição de quimotripsina foi realizado igual ao ensaio de inibição da tripsina. A quimotripsina foi diluída em solução de HCl 1mM para

uma concentração final de 1µM, com o substrato específico para quimotripsina (N – glutaryl – L – phenylalanine – p – nitroanilide – GPNA) preparado 1:1 volume:volume em DMSO e o tampão de ensaio para quimotripsina (Tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM pH 7,6) a 200 µg/mL. O ensaio também foi realizado por absorvância em placa de 96 poços, por triplicata com comprimento de onda em 410 nm no espectrofotômetro *M2e spectrophotometer* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Diferentemente de outros trabalhos, as velocidades iniciais da cinética de tripsina e quimotripsina foram calculadas para cada concentração de BTCI utilizada, e a porcentagem de atividade enzimática relativa foi determinada em relação ao controle das enzimas sem BTCI e à concentração máxima de BTCI. As curvas de atividade relativa em relação à concentração de BTCI foram ajustadas à função de Boltzmann de acordo a Equação (1) para determinar a concentração de BTCI em que ocorrem 50% de inibição das moléculas de enzima (IC₅₀). Este valor de IC₅₀ é uma medida da capacidade inibidora de BTCI para Tripsina e quimotripsina.

$$\%Ativ. Relativ. = \frac{A_1 - A_2}{(1 + e^{-\frac{X - X_0}{dx}})} + A_2 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, % *Ativ. Relativ.* é a atividade inibitória relativa de BTCI a respeito a atividade da enzima sem BTCI (A₁=100%) e a concentração máxima do inibidor analisado (A₂= 0%); X corresponde a concentração de BTCI e X₀ corresponde ao valor onde metade da %*Ativ. Relativ.* é alcançada. O X₀ representa ao IC₅₀ do ensaio.

III.3. Análise da atividade inibitória do BTCI contra tripsina por espectroscopia de emissão de fluorescência.

Neste ensaio, a atividade enzimática da tripsina foi medida em relação à presença do BTCI em concentrações diferentes. Para um controle negativo, foi utilizado apenas o substrato VI fluorogênico específico para atividade tripsina-like do Proteassoma (Sigma-Aldrich) dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO) a 500 mg/mL. A sequência desse substrato é Z-Ala-Arg-Arg-AMC (Z-ARR-AMC)

onde Z é o grupo Benzyloxycarbonyl, e AMC é 7-Amido-4-MethylCoumarin Z-ARR-AMC, Para o controle positivo, a amostra era constituída por 1 uL de tripsina a 1,57 mg/mL e tampão para um volume de ensaio de 50 uL e 1 uM de enzima final. O controle negativo foi constituído só com tampão sem enzima. O ensaio de inibição da enzima foi realizado da mesma maneira que o controle positivo, entretanto, houve adição de concentrações crescentes de BTCI de 0,01-5 uM. As amostras controles e com enzima e inibidor foram incubadas por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, em seguida, 1,56 uL de substrato foram adicionados em cada ensaio. Depois de outra hora de incubação, foram adicionados 50 uL a mais de tampão e os espectros (400-500 nm) das amostras foram lidas em um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), acoplado a um sistema automático de leitura de placa *Auto-Sampler ASU-605* (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), com comprimento de onda de excitação de 380 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

III.4. Expressão e Purificação do proteassoma (PTS20S)

III.4.1. Purificação do proteassoma 20S de levedura

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Professor Visitante Dr. Aisel Valle Garay do laboratório de biofísica molecular, do departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.

O processo de obtenção do proteassoma 20S (PTS20S) foi realizado utilizando colonias recombinantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foram transformadas com o gene que codifica o PTS20S. Esta levedura é da linhagem RJD1144 (MATa his3_200 leu2-3,112, lys2-801 trp1_63 ura3-52 PRE1^{FH}::*Yplac211* URA3), onde apresenta uma cauda de histidina fusionada a subunidade β 4 do PTS20S. Esta levedura foi cedida pela Dra. Marilene Demasi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantã, São Paulo, Brasil. O crescimento da levedura foi realizado no meio de cultura YPD, contendo glicose 4% (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 4% de glicose) por 60 horas, a 30 °C, sob agitação de 220 rpm.

Após o tempo de incubação estimado, o cultivo foi dividido em garrafas de 500 mL de capacidade apropriadas para centrifugação. A obtenção das células foi realizada por centrifugação a uma rotação de 8000 x g por 30 minutos. Após este processo o *pellet* celular obtido foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo MgCl₂ 5 mM e KCl 20 mM, e as células lisadas por sonificação. Este processo foi realizado em volumes de 50 mL por 8 minutos, 50% de intervalo de tempo sonificando, à intensidade de 7. Em seguida, o extrato celular lisado foi centrifugado a uma rotação de 11000 x g por 15 minutos a 4 °C.

Este sobrenadante obtido foi centrifugado por 2 vezes conforme descrito anteriormente, para estar límpido e claro,. Para obtenção do PTS20, foi realizado inicialmente uma cromatografia de afinidade utilizando colunas de níquel *HisTrapTM HP* (GE Healthcare, EUA), seguindo o manual do fabricante, a um fluxo de 1 mL/min. A eluição do proteassoma foi realizada em gradiente linear de imidazol de 0 até 0,4 M no sistema *ÄKTA prime* (GE Healthcare, EUA). Em seguida, utilizando o material extraído das frações específicas do pico e diluído-as à metade da condutividade (\approx 20 mS/cm), foi feita uma cromatografia de troca iônica em uma coluna *Mono Q 4.6/100 PE* (GE Healthcare, EUA) utilizando o sistema *ÄKTA pure* (GE Healthcare, EUA) a um fluxo de 0,3 mL/min. Nesta etapa o proteassoma foi eluído em um gradiente linear de NaCl de 0 até 1 M.

III.4.2. Análise da pureza do P20S

A pureza das amostras foi avaliada por ensaios de eletroforese em gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio) (SDS-PAGE 15%). O gel separador foi preparado com poli(acrilamida 15% m/v [34], sendo acrilamida 14,5% e bisacrilamida 0,5%, tris-HCl 250 mM pH 8,8; SDS 0,3% m/v, persulfato de amônia (PSA) 0,1% e 3 μ l tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel concentrador foi preparado com poli(acrilamida 5% m/v (sendo acrilamida 4,85% e bisacrilamida 0,15%), tris-HCl 140 mM pH 6,8, SDS 0,3% m/v, PSA 0,1% m/v e 3 μ l TEMED. O procedimento foi executado utilizando uma fonte de eletroforese *EPS301* (Amersham Pharmacia Biotech, Suíça) e tampão de corrida contendo Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% m/v e pH \approx 8,3,

conforme Laemmli [34]. A corrente para cada gel e tensão aplicadas foram limitadas a 35 mA e 220 V, respectivamente. Os géis foram utilizados a coloração *Coomassie brilliant blue* R-250 0,1% m/v, metanol 50% v/v e ácido acético 10% v/v) e descorados com água destilada morna. As amostras analisadas eram de alíquotas de aproximadamente 50 µl de frações coletas durante processo de purificação.

III.4.3. Análise do tamanho e estado oligomérico do P20S

As medições de espalhamento por luz dinâmica (ELD) foram feitas em um *Zetasizer Nano Series Nano-ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinação do tamanho de partícula/moléculas a 20 °C. Um laser He-Ne com $\lambda = 633 \text{ nm}$ foi usado para medições, em ângulo de 173°, com detecção de retrodispersão, usando uma cubeta de plástico. Os experimentos foram realizados utilizando as amostras coletadas após a cromatografia de troca iônica. Antes das medições, as amostras de proteossoma 20S purificadas foram centrifugadas a 14000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, e deixada no vácuo, dentro da cubeta por 5 minutos, para eliminar a presença de partículas de pó e micro bolhas de ar nas amostras. O ELD foi utilizado para avaliar as populações das proteínas em solução, verificando a polidispersividade, a massa molecular e diâmetros hidrodinâmicos.

III.4.4. Determinação da concentração de P20S

A concentração de proteossoma contido nas alíquotas coletadas após purificação foi determinada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro V-530 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão). Essa concentração foi estimada com o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,22 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [35] seguindo a lei de Lambert-Beer, considerando a correlação da absorbância (no caso, em 280 nm) pela concentração da amostra. As leituras foram feitas em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, a temperatura ambiente.

$$C = A / \epsilon \cdot \ell$$

em que, C é a concentração molar do P20S; A é absorvância da amostra; ϵ é o coeficiente de absorbtividade molar; l é o caminho óptico pelo feixe de luz (1 cm).

III.5. Interação e atividade inibitória do PTS20S pelo BTCI

III.5.1. Ensaio de inibição da atividade peptidase do PTS20S por espectroscopia de fluorescência

A atividade enzimática do proteassoma 20S foi medida em relação à atividade catalítica tipo *tripsina-like* na presença do BTCI em concentrações diferentes. Para um controle negativo, foi utilizado apenas 1,56 uL do substrato fluorogênico específico Z-Ala-Arg-Arg-AMC (Z-ARR-AMC) a 500 mg/mL em dimetilsulfoxido, (DMSO) para 50 uL de volume de ensaio final com tampão. Para o controle positivo, a amostra foi constituída por 1 uL de proteassoma a 0,14 uM e tampão até volume final de ensaio de 50 uL. O ensaio de inibição do proteassoma foi realizado da mesma maneira que o controle positivo, entretanto, houve uma análise das amostras em relação a concentrações crescentes de BTCI de 0,01-5 uM. As amostras foram incubadas por aproximadamente 1 hora, a temperatura ambiente, em seguida 1,56 uL de substrato foi adicionado em cada ensaio. Após uma hora de incubação, foram adicionados 50 uL a mais de tampão e os espectros (400-500 nm) das amostras foram obtidos em um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), acoplado a um sistema automático de leitura de placa *Auto-Sampler ASU-605* (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), com comprimento de onda de excitação de 380 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

IV. Resultados e discussão

IV.1. Purificação do BTCI

O inibidor de proteases, BTCI, foi extraído e purificado de sementes de feijão, do tipo *Vigna unguiculata*. A figura 9 corresponde ao cromatograma obtido na purificação do extrato proteico em uma coluna de troca iônica do tipo DEAE-celulose, por coleta da absorbância no comprimento de onda de 280 nm no equipamento AKTA Prime (GE Healthcare, EUA). O cromatograma apresenta quatro picos proteicos, sendo o BTCI purificado encontrado no quarto pico (IV) com valor máximo de condutividade de 1388,957 mAu.

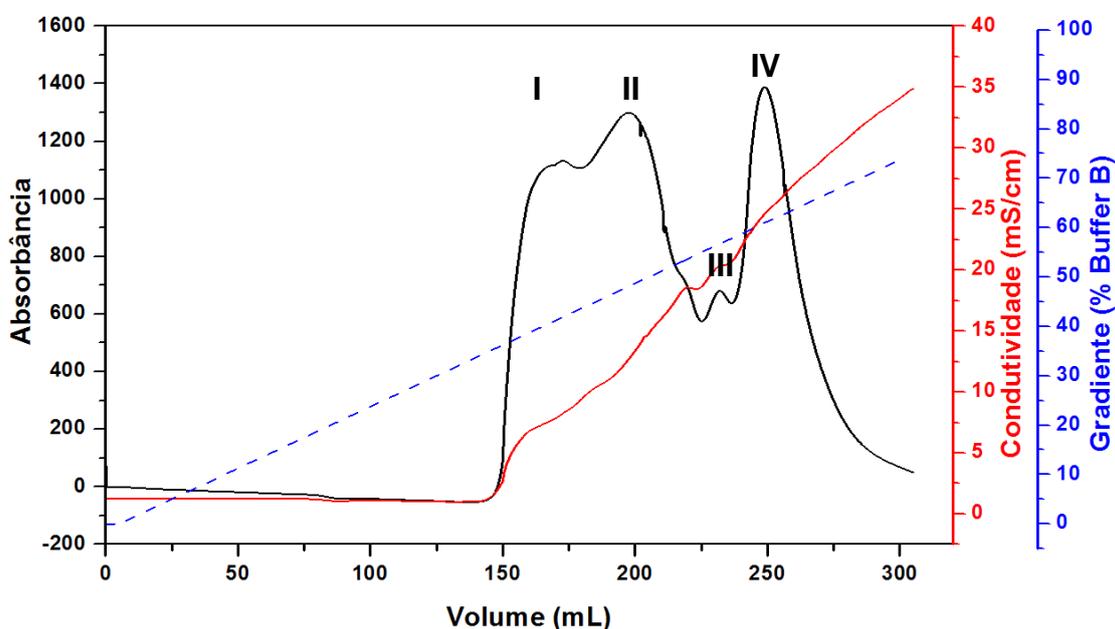


Figura 9 - Cromatograma correspondente à purificação do inibidor de protease BTCI obtido por troca iônica, monitorado pelo equipamento AKTA onde o comprimento de onda fixado foi de 280 nm. Os quatro picos foram eluídos em um gradiente de NaCl (representado pela linha pontilhada azul), sendo o pico IV (≈ 25 mS/cm) correspondente ao BTCI purificado.

A pureza do BTCI foi confirmada por espectrometria de massas (figura 10), com pico de intensidade correspondente à massa molecular de 9105,957 Da. Essa análise de massas foi feita pelo Prof. Dr. Marcelo Ramada da Universidade Católica de Brasília, colaborador deste projeto.

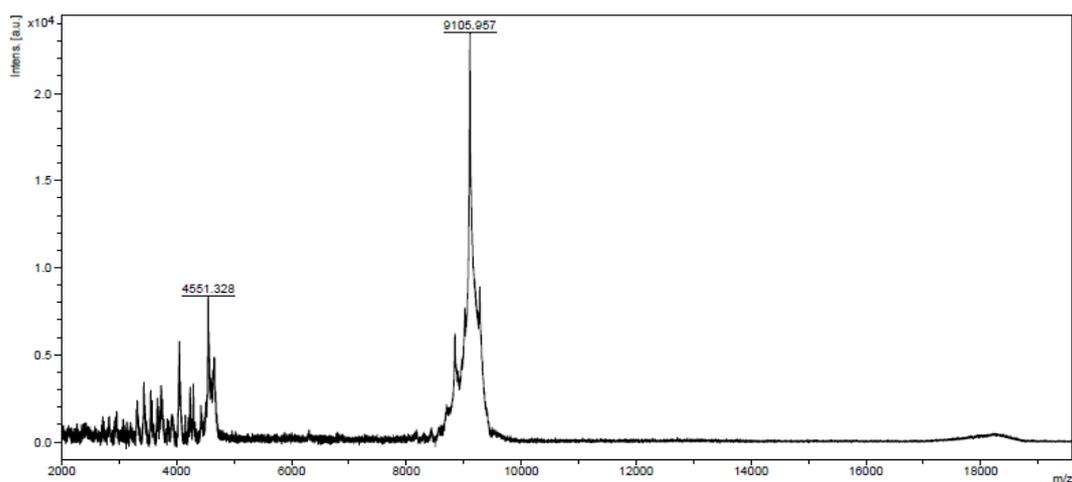


Figura 10 – Análise por espectrometria de massas do BTCL, a massa do inibidor ionizado é 9105,957 Da. A massa do inibidor duplamente ionizado é 4551,328 Da. O BTCL foi analisado em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF *UltraFlex III* sob controle do programa computacional *Flex Control 3.3* (*BrukerDaltonics*, Alemanha).

IV.2. Ensaio da atividade inibitória do BTCL contra tripsina e quimotripsina

IV.2.1. Análise da atividade inibitória do BTCL por espectroscopia de ultravioleta e visível (Uv-vis)

Os ensaios de inibição da atividade enzimática da tripsina e da quimotripsina foram realizados fixando a concentração destas enzimas e analisando o efeito da inibição do BTCL de forma cinética de amostras que apresentaram concentrações variadas de inibidor. Os ensaios foram monitorados pela absorvância em um comprimento de onda de 410 nm em relação ao tempo. Cada enzima apresenta um substrato cromogênico específico. Para a tripsina, foi usado o N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide (BAPNA) e, para a quimotripsina, foi usado o N α -Glutaryl-L-phenylalanine 4-nitroanilide (GPNA), ambos obtidos da Sigma-Aldrich. A figura 11 apresenta o estudo de forma cinética da inibição referente a algumas concentrações de BTCL

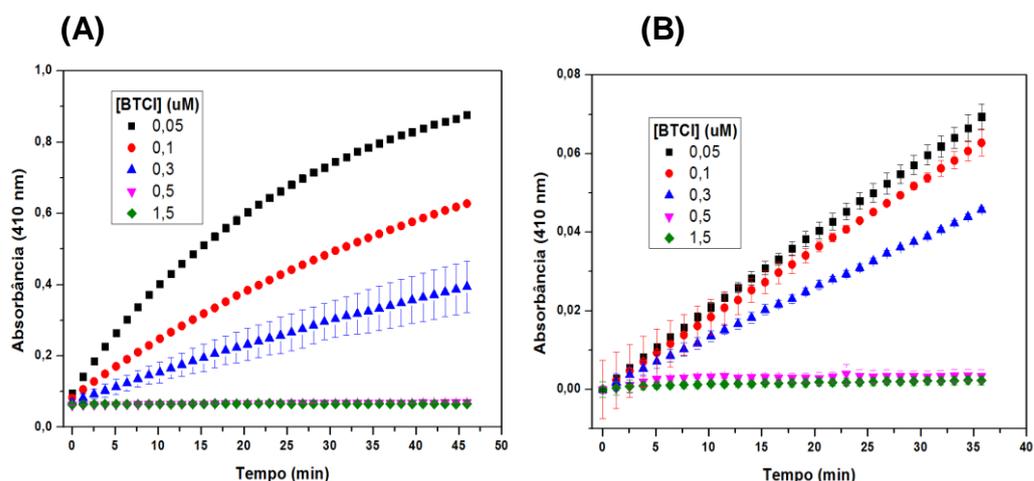


Figura 11 – Análise da cinética de inibição referente as concentrações 0,05 uM, 0,1 uM, 0,3 uM, 0,5 uM e 1,5 uM por espectroscopia de ultravioleta e visível a um comprimento de onda de 410 nm; As concentrações de 400 nM e 1 uM de tripsina e quimotripsina foram usadas, respectivamente. (A) corresponde a cinética de inibição da tripsina; (B) corresponde a cinética de inibição da quimotripsina;

A partir dos dados cinéticos foi possível obter os valores de velocidade inicial relativos à atividade enzimática, em relação à concentração de BTCI. As velocidades iniciais foram determinadas a partir do coeficiente angular de ajuste lineal das curvas cinéticas de atividade, durante o primeiro intervalo de tempo de acordo com a concentração do inibidor. Os dados de atividade foram normalizados como atividade relativa à atividade enzimática na ausência de BTCI (100% de atividade) e na presença da maior concentração de BTCI (0% de atividade). Os resultados de atividade relativa, relacionados a cada concentração de BTCI, foram ajustados não linearmente pela equação de Boltzmann, de acordo com a equação (1). A figura 12 representa a atividade inibitória do BTCI contra tripsina e a quimotripsina, mostrada em preto e vermelho, respectivamente.

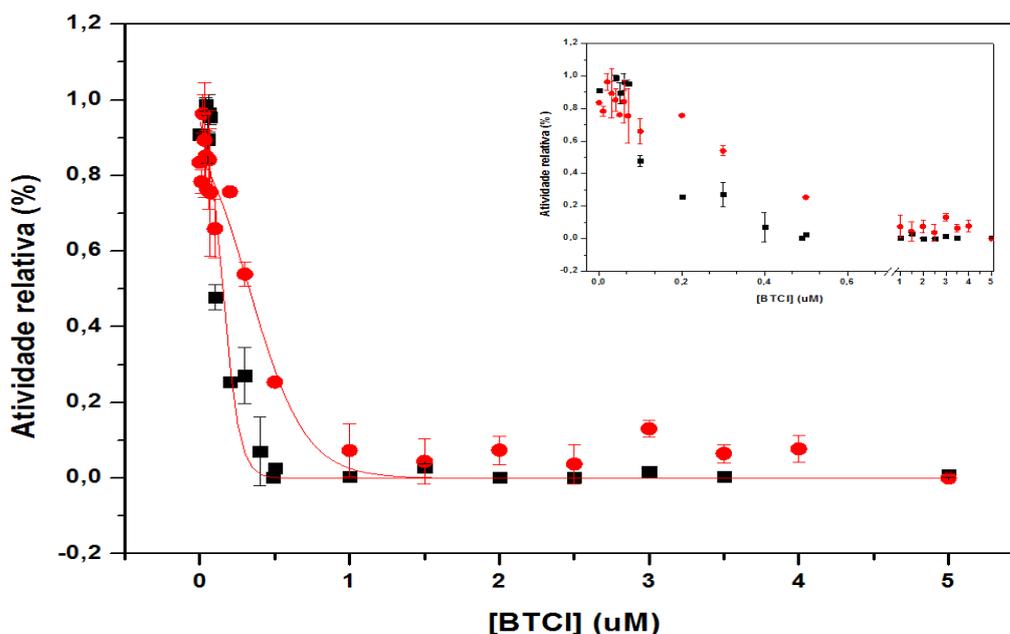


Figura 12 – Perfil da atividade enzimática relativa na presença de BTCI em concentrações crescentes de 0 até 5 uM. Em vermelho está representado o ensaio com quimotripsina onde foi utilizado o substrato cromatogênico GPNA. Em preto está representado o ensaio com tripsina onde se utilizou o substrato cromatogênico BAPNA. Em ambos os ensaios a atividade enzimática foi monitorada por absorvância a 410 nm. As concentrações de 0,4 uM e 1 uM de tripsina e quimotripsina foram usadas, respectivamente.

Tabela 1- Tabela com valores de IC_{50} , concentração mínima de BTCI para inibir toda a enzima no ensaio (relação $2 \times IC_{50}/[Enzima]$), e a variação da concentração de BTCI ($\partial_{[BTCI]}$) para experimentar uma diminuição de uma unidade de % de atividade relativa, para as enzimas tripsina e a quimotripsina com seus respectivos erros.

Enzima	IC_{50} (uM)	$\frac{2 \cdot IC_{50}}{[Enzima]}$	$\partial_{[BTCI]}$ (uM)
Tripsina	$0,15 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,01$
Quimotripsina	$0,33 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,02$

A partir do ajuste não linear de Boltzmann foi possível obter o valor do IC_{50} , que representa a concentração de inibidor que inibe o 50% da atividade enzimática. Em relação à tripsina, representada em preto, a concentração necessária de BTCI para inibir 50% da atividade enzimática é de 0,15 uM de BTCI (Tabela 1 Figura 12B). Já para a quimotripsina é necessário uma

concentração de 0,33 uM de BTCl (tabela Figura 12B). Se consideramos a concentração de Tripsina a 0,4 uM e quimotripsina 1,0 uM nos ensaios, podemos determinar a relação entre o dobro de IC_{50} e as concentrações de essas enzimáticas. Os valores obtidos seriam uma medida aproximada do número de moléculas de BTCl que são requeridas para inibir totalmente as moléculas de enzima no ensaio. Os resultados indicam que ambas as enzimas mostram um mesmo valor próximo a 0,7. Portanto, a capacidade inibitória do BTCl, não dependente do tempo, pois é muito semelhante para ambas as enzimas. No entanto, as taxas de diminuição da atividade enzimática relativa em relação à concentração de BTCl são diferentes entre as duas enzimas. A Tripsina mostra uma variação de 0,05 uM de BTCl para experimentar uma diminuição de 1% na atividade relativa da enzima no valor de IC_{50} , de acordo com a inclinação da curva decrescente do gráfico. Enquanto para quimotripsina, o valor é de 0,18 uM para ocorrer uma diminuição de 1% na atividade relativa no valor de IC_{50} . Portanto, a relação entre estes parâmetros indicam que o BTCl inibe a Tripsina aproximadamente 3,6 vezes mais rápida e eficientemente que a quimotripsina.

Portanto, esse resultado mostra há uma maior eficiência e/ou rapidez catalítica na inibição do BTCl em relação à tripsina, já que, para esta enzima, é necessária uma menor quantidade de inibidor para reduzir sua atividade enzimática relativa.

IV.2.2. Análise da atividade inibitória do BTCl sobre tripsina por fluorescência

O ensaio de fluorescência sobre a atividade inibitória do BTCl sobre a tripsina foi feita mediante a leitura dos espectros (400-500 nm), depois de excitação a 380 nm, no espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), a um sistema automático de leitura de placa *Auto-Sampler ASU-605* (*Jasco Analytical Instruments*, Japão). Os ensaios foram realizados em triplicata.

O estudo de emissão de fluorescência foi realizado com o substrato fluorogênico específico Z-Ala-Arg-Arg-AMC (Z-ARR-AMC) e analisando amostras com quantidade crescentes de BTCl. Na figura 13, é possível conferir

a diminuição da intensidade de fluorescência nos espectros como indicativo da diminuição da hidrólise de substrato devido a inibição da tripsina, a medida que se aumenta a concentração de BTCl.

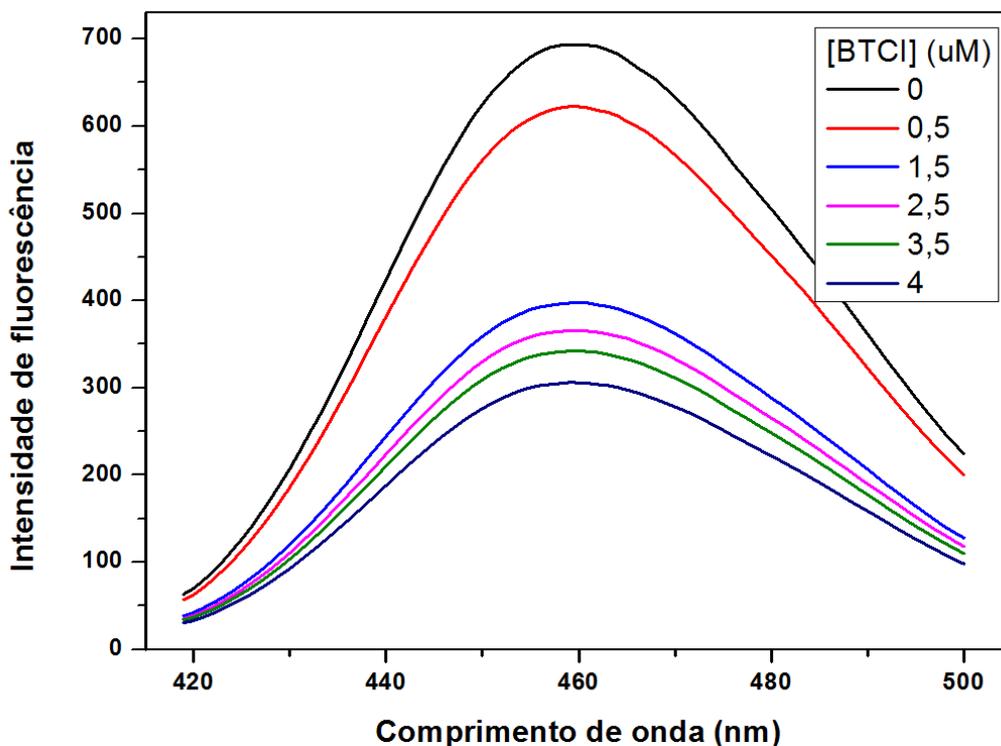


Figura 13- Espectro de emissão de fluorescência para análise da inibição da tripsina (1,31 µM) feita pelo BTCl. Estudo feito com concentrações de 0 µM, 0,5 µM 1,5 µM, 2,5 µM, 3,5 µM e 4 µM de BTCl.

O aumento gradual da concentração do BTCl no ensaio mostrou que houve uma diminuição da emissão de fluorescência. A análise sobre a atividade inibitória foi feita de duas maneiras, uma análise foi realizada em função da intensidade máxima de fluorescência emitida em relação a cada concentração. A outra medida foi feita em relação à área abaixo do pico de intensidade de fluorescência relevante a cada concentração de BTCl. A partir desses valores foi feito um ajuste, utilizando a equação de Boltzmann, de acordo com a equação (1), para assim, encontrar o valor do IC_{50} . A figura 14 apresenta estas análises de máximo de intensidade e em relação à área do gráfico com seus respectivos ajustes não lineares, utilizando a equação de Boltzmann.

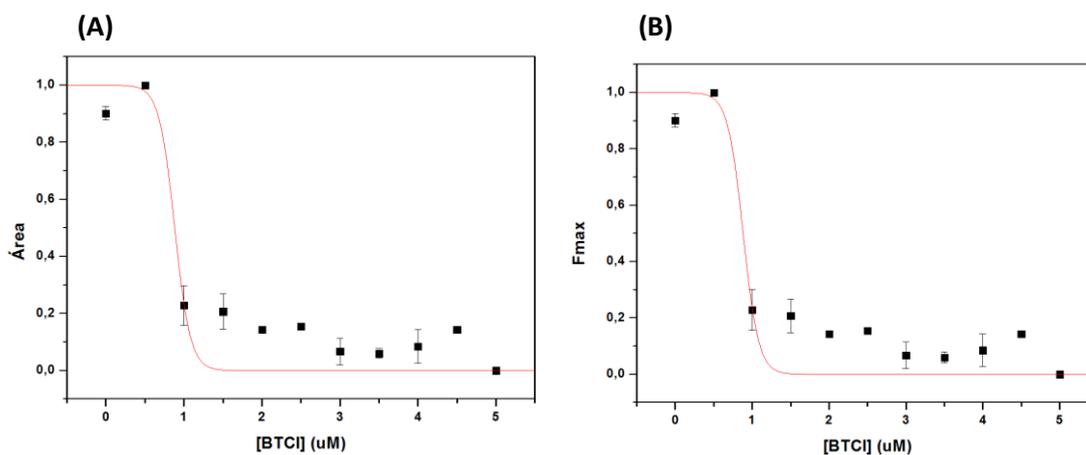


Figura 14- Análise de inibição da tripsina a concentrações crescentes de BTCI de 0,1-5 uM; (A) corresponde a análise em relação à área abaixo dos picos; (B) corresponde a análise em relação a intensidade máxima de fluorescência;

Tabela 2- Tabela com valores do IC_{50} e o erro para a tripsina. A concentração de Tripsina no ensaio foi de 1,31 uM.

Tripsina	IC_{50} (uM)
Área	$0,881 \pm 0,147$
Fmax	$0,881 \pm 0,116$

A partir do ajuste não linear de Boltzmann, foi possível obter o valor do IC_{50} . O BTCI apresentou um IC_{50} de 0,881 uM tanto para a análise em reação a área quanto para o F_{max} , verificando-se concordância entre os dois métodos de análises. É possível concluir que é necessário no mínimo aproximadamente 1,34 uM de BTCI para inibir toda da atividade da tripsina correspondente a 1,31 uM de enzima. Ou seja, praticamente numa proporção 1:1 de BTCI:Enzima, o que corrobora a emissão de fluorescência ser um método mais sensível, que a absorvância UV-visível para avaliar a atividade inibitória do BTCI.

IV.3. Purificação proteassoma 20S de levedura

Após o crescimento da levedura e preparação do extrato, a primeira etapa para a purificação do proteassoma 20S foi feita por cromatografia de afinidade a níquel em colunas *HisTrap HP* no sistema de *ÄKTA prime* (*GE Healthcare*, EUA), monitorando a absorvância num comprimento de onda a 280 nm. A eluição da proteína teve início a 27,5% e apresentando seu valor máximo próximo a 33% do tampão B que contem imidazol. A figura 15, corresponde ao

cromatograma obtido na purificação do proteassoma 20S por afinidade, realizado:

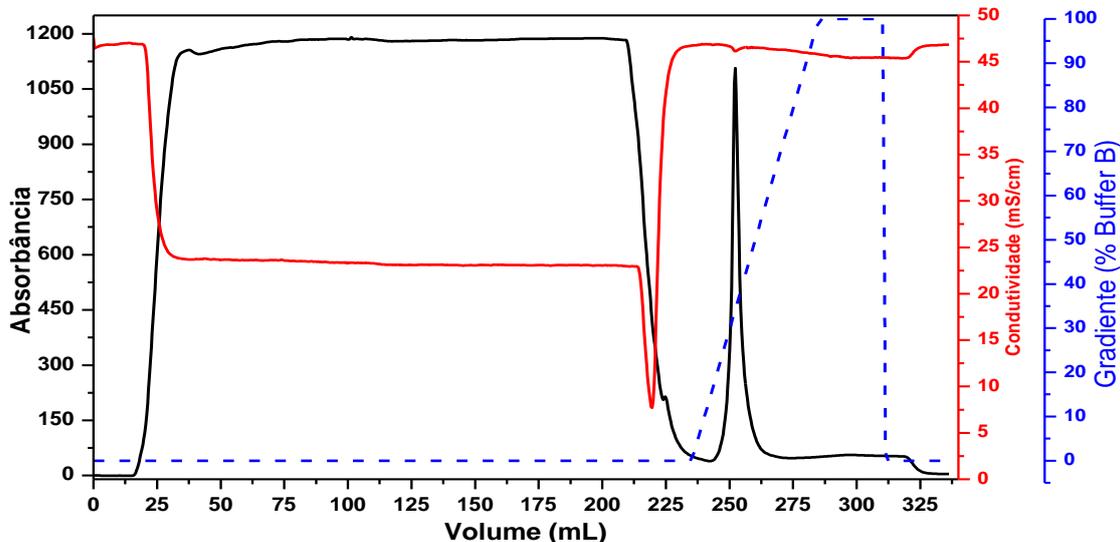


Figura 15- Primeira etapa de purificação do proteassoma 20S de levedura. Perfil de cromatografia de afinidade por quelatos metálicos (Ni^{+2} /His-tag), onde a linha vermelha representa a condutividade, a linha pontilhada em azul é proporcional ao gradiente linear de tampão B (em porcentagem) e a linha preta referente à absorbância a 280 nm.

Após realizar a cromatografia de afinidade, foi feita a coleta das frações relativa ao pico. Esta amostra foi diluída com água até $\approx 20\text{mS/cm}$. Então, foi realizada uma cromatografia de troca iônica com colunas MonoQ 4.6/100 PE (GE Healthcare, EUA) utilizando o sistema ÄKTA pure (GE Healthcare, EUA), para monitorar a absorbância com o comprimento de onda a 280 nm. A eluição da amostra referente ao proteassoma teve início a 75,9% e apresentando seu valor máximo próximo a 76,5% do tampão B que contem NaCl a uma condutividade de $\approx 30\text{ mS/cm}$. A figura 16, representando esta cromatografia de troca iônica.

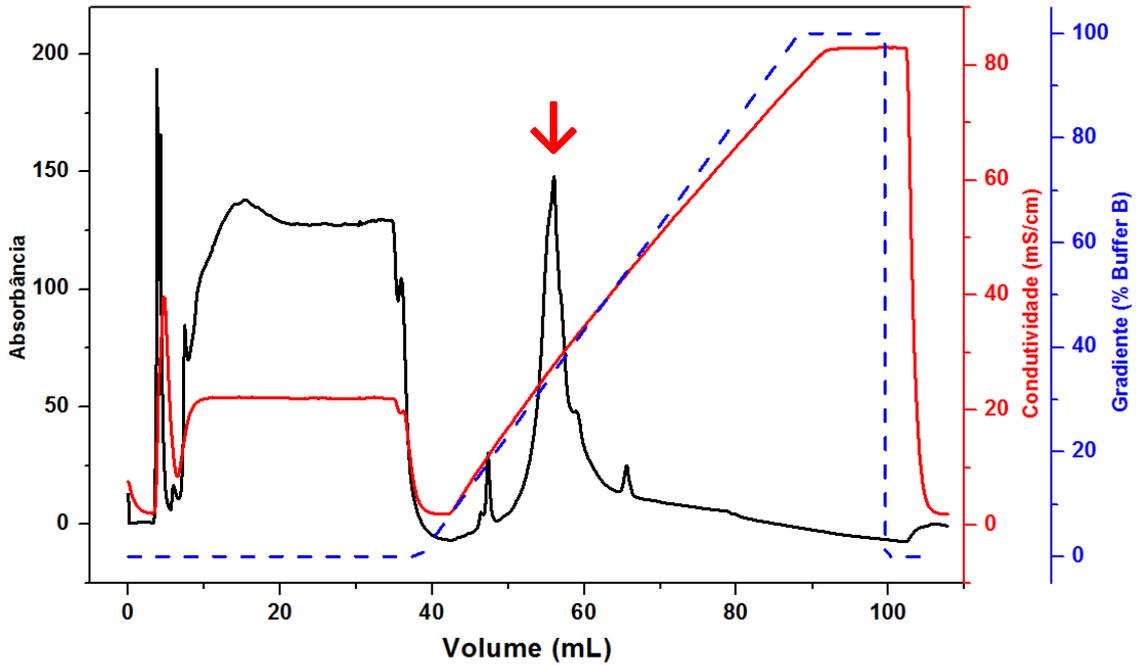


Figura 16. Cromatograma de troca iônica do proteassoma 20S de levedura. Perfil de cromatografia monoQ, onde a linha vermelha representa a condutividade, a linha pontilhada em azul é proporcional ao gradiente linear de tampão B (em porcentagem), a linha preta referente à absorbância a 280 nm e a seta vermelha correspondente ao pico onde está o proteassoma 20S.

A presença do proteassoma 20S foi confirmada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. A figura 17 mostra os resultados de diversas amostras coletadas durante a purificação, para verificar se havia perda proteica e também para confirmar a presença do P20S no final da purificação. A cromatografia de troca iônica apresentou 3 picos e foi feita a análise de todos. Os poços 1, 2 e 3 correspondem a esses picos, o poço 1 representa o pico indicado com a seta vermelha, poço que se confirmou a presença das subunidades constitutivas do proteassoma 20S com as massas moleculares entre 20-30 kDa [35]. Os poços 4, 5 e 7 são referentes à cromatografia de afinidade. No poço 5 observa-se diversas subunidades proteassomais. O poço 6 é a referência de proteínas de massas moleculares padrões. O poço 8 corresponde a amostra que foi utilizada na primeira cromatografia, ou seja, o sobrenadante obtido após a centrifugação.

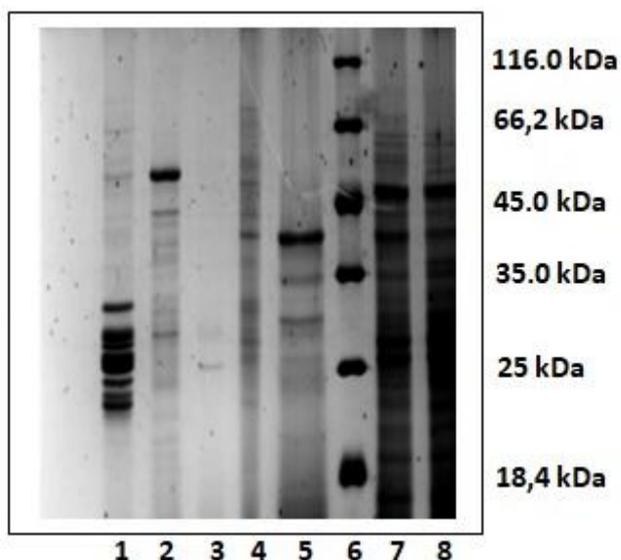


Figura 17 - SDS-PAGE 15% de poliacrilamida, onde, **poço 1**: pico indicado pela seta vermelha na cromatografia com a coluna monoQ referente ao proteassoma 20S purificado; **poço 2**: primeiro pico no cromatograma da monoQ; **poço 3**: terceiro pico do cromatograma da monoQ; **poço 4**: fração lavada com NaOH; **poço 5**: fração retirada da Histag; **poço 6**: padrão do tipo Thermo; **poço 7**: parte não ligada na coluna Histag; **poço 8**: sobrenadante analisado por cromatografia;

Para uma última confirmação se amostra obtida na cromatografia de troca iônica monoQ corresponde ao proteassoma 20S oligomerizado, foi realizada análise de espalhamento de luz (ELD), indicado pelo baixo valor da polidispersividade de 23,6% (polidispersa). A massa molecular obtida foi de aproximadamente 686,9 kDa, correspondendo a um valor próximo ao referenciado ao PTS20 (~ 700 kDa) e seu diâmetro hidrodinâmico observado foi de $19.42 \pm 4,58$ nm.

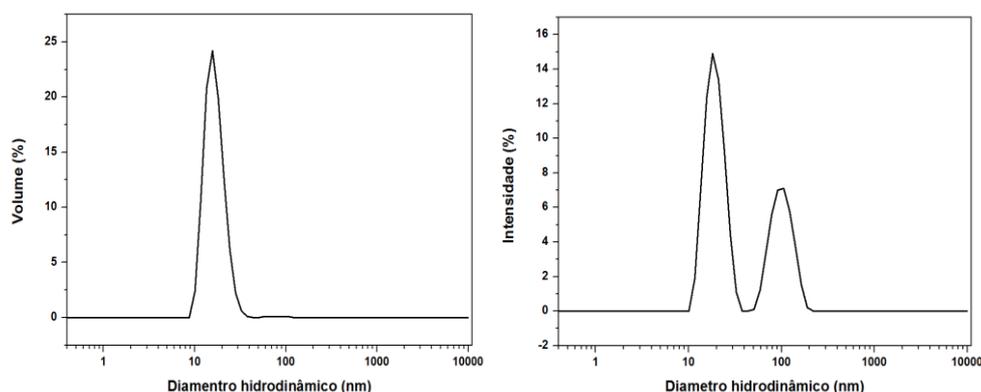


Figura 18- Análise de espalhamento de luz- análise do pico correspondente ao proteassoma 20S, com diâmetro hidrodinâmico de 19,42 nm e massa estimada de 686,9 kDa;

A concentração do proteassoma 20S foi estimada seguindo a lei de Beer-Lambert por espectrofotometria, considerando o comprimento de onda fixado (280 nm) e o coeficiente de absorbtividade molar para o proteassoma 20S de $1,22 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV.4. Ensaio de inibição do proteassoma 20S pelo BTCl por fluorescência

O ensaio de fluorescência sobre a atividade inibitória do BTCl sobre o proteassoma 20S quanto à atividade catalítica tipo *tripsina-like* foi feita mediante a leitura dos espectros (400-500 nm), depois de excitação a 380 nm, no espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (*Jasco Analytical Instruments*, Japão), a um sistema automático de leitura de placa *Auto-Sampler ASU-605* (*Jasco Analytical Instruments*, Japão). Os ensaios foram realizados em triplicata. O estudo de emissão de fluorescência foi realizado com o substrato fluorogênico específico Z-Ala-Arg-Arg-AMC (Z-ARR-AMC) e analisando amostras com quantidade crescentes de BTCl. Na figura 19, estão os resultados da intensidade da fluorescência versus concentração que indicam a inibição atividade proteolítica tipo tripsina-like do proteassoma 20S à medida que se aumenta a concentração de BTCl.

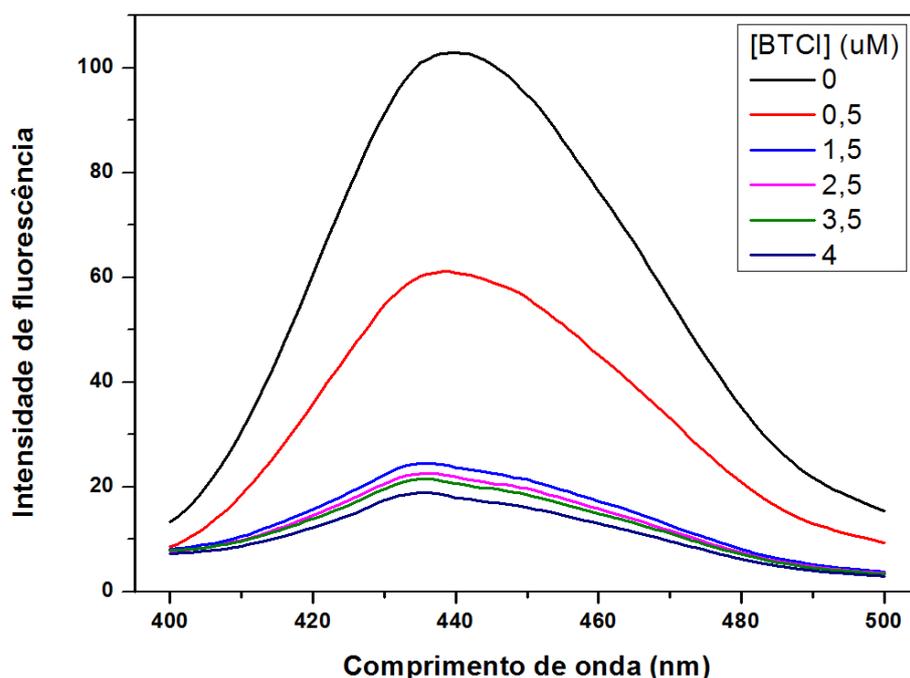
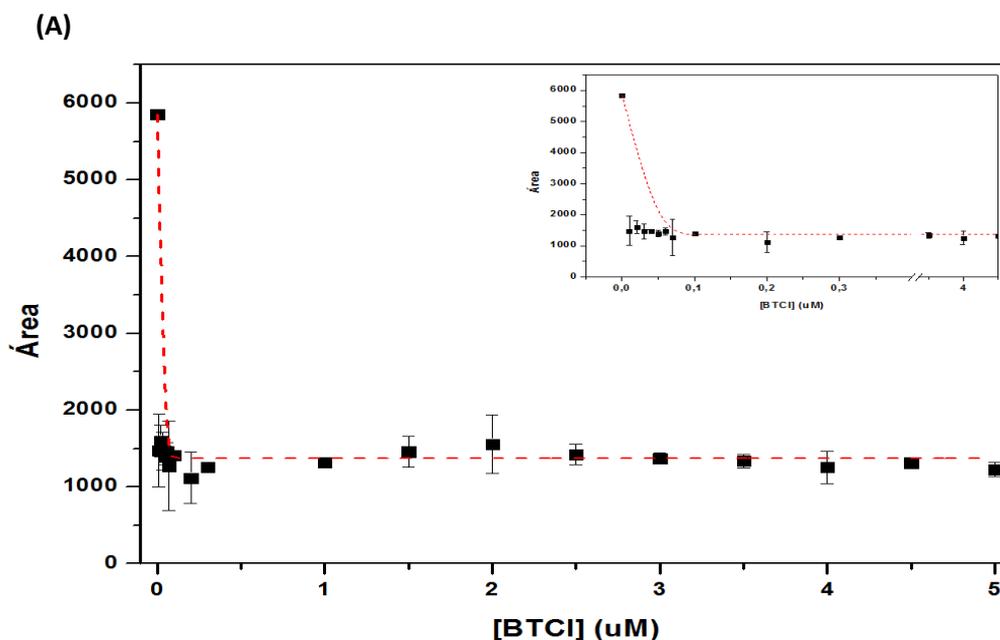


Figura 19 - Espectro de emissão de fluorescência para análise da inibição do proteassoma 20S (0,0028 uM) feita pelo BTCl. Estudo feito com concentrações de 0 uM, 0,5 uM 1,5uM, 2,5 uM, 3,5 uM e 4,0 uM de BTCl.

A intensidade de fluorescência observada neste experimento foi menor comparada ao ensaio de fluorescência com tripsina. Isso ocorre, pois há uma concentração bem menor de proteassoma utilizada do que tripsina.

Com o aumento gradual de concentração do BTCl foi possível verificar uma diminuição na emissão de fluorescência. A análise sobre a atividade inibitória do proteassoma foi feita de duas maneiras, uma análise foi realizada em função intensidade máxima de fluorescência emitida (F_{max}) em relação à cada concentração. A outra medida foi feita em relação à área abaixo do pico de intensidade de fluorescência relevante a cada concentração de BTCl. A partir desses valores foi feito um ajuste não linear, utilizando a equação de Boltzmann, representada pela equação (1), para assim encontrar o valor do IC_{50} , de forma semelhante ao realizado anteriormente. A figura 20 apresenta



estas análises de máximo de intensidade e em relação a área do gráfico com seus respectivos ajustes não linear utilizando a equação de Boltzmann.

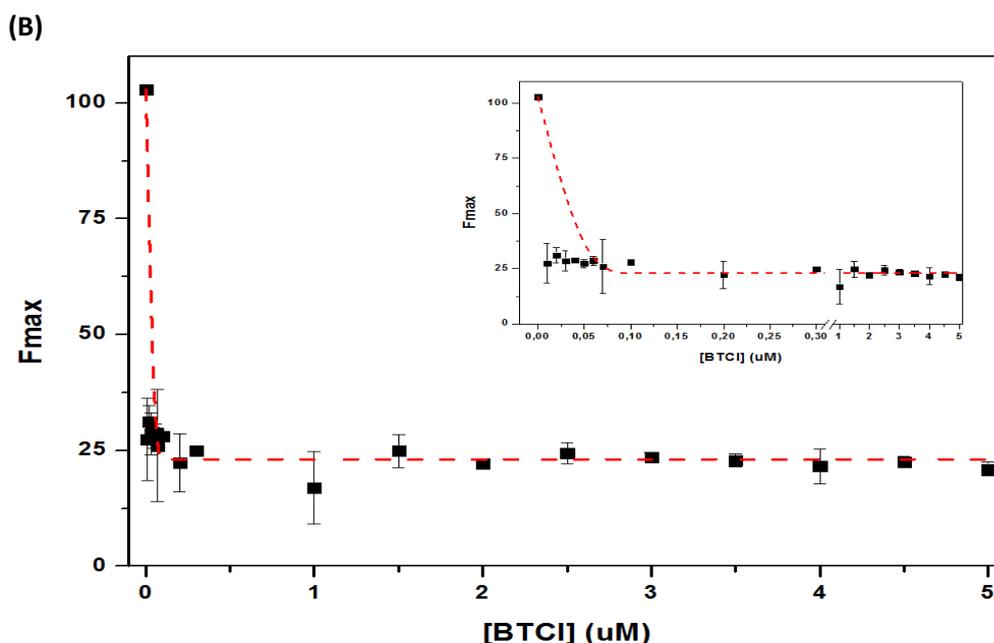


Figura 20- Análise de inibição do proteassoma às concentrações crescentes de BTCI de 0,1 – 5 uM; (A) corresponde a análise em relação a área; (B) corresponde a análise em relação a intensidade máxima de fluorescência;

Tabela 3- tabela com os valores de IC₅₀ referentes à área e ao F_{max} do proteassoma 20S a uma concentração de 0,0028 uM.

Proteassoma	IC ₅₀ (uM)
Área	0,0074
F _{max}	0,0085

A partir do ajuste não linear de Boltzmann foi possível obter o valor do IC₅₀. O BTCI apresentou um mesmo valor de IC₅₀ de 0,008 uM, quando analisado em relação a área e ao F_{max}. Esse parâmetro não pôde ser determinado com boa precisão devido à baixa concentração de BTCI na qual acontece a inibição. Então, é possível inferir que, se o proteassoma 20S têm 2 subunidades β-2 com atividades tripsina-like, no ensaio tem 0,0056 uM dessas subunidades catalíticas, então é necessário um mínimo de 2,87 uM de BTCI para inibir toda a atividade catalítica tipo tripsina-like das moléculas de proteassoma 20S presente no ensaio. Contudo, na prática, essa concentração foi bem mais baixa, provavelmente devido à falta de precisão na determinação do parâmetro IC₅₀, ou ao uso de uma estequiometria de inibição diferente da equimolar, incluindo até mesmo a inibição da tripsina e quimotripsina simultaneamente nas subunidades catalíticas do proteassoma.

V. Conclusões

- O inibidor de proteases, BTCI, foi purificado satisfatoriamente e apresentou atividade inibitória conforme esperado para tripsina, quimotripsina e proteassoma.
- A extensão da inibição de BTCI nas enzimas tripsina e quimotripsina, entendida como a relação mínima de inibidor:enzima necessária para observar 100% de inibição da atividade, são semelhantes e aproxima-se de 0,7; de acordo com os ensaio de absorção UV-visível. Porém, o BTCI inibe a tripsina aproximadamente 3,6 vezes mais rápida e eficientemente que a quimotripsina.
- Ao analisar, por espectrometria de fluorescência, o efeito inibitório do BTCI sobre a tripsina, foi verificado que o IC_{50} , tanto em relação à área quanto ao F_{max} , apresentou um valor menor que 0,88 μ M. Portanto, para 1,31 μ M de enzima, é necessário, aproximadamente, 1,34 μ M de BTCI para inibir toda da atividade da tripsina com uma proporção 1:1 BTCI:Enzima, sendo mais sensível e eficiente o método de emissão de fluorescência que a absorbância UV-visível para avaliar a atividade inibitória do BTCI.
- A purificação do proteassoma 20S de levedura foi realizada de maneira eficaz, mantendo seu estado oligomérico, mediante a combinação de os princípios cromatográficos diferentes de afinidade e troca iônica, e com alto grau de pureza de acordo com as análises de eletroforese e de EDL.
- A inibição da atividade tripsina-like do proteassoma feita pelo BTCI foi significativa, ao analisar a inibição por emissão de fluorescência, com um valor de IC_{50} de 0,008 μ M, que demonstra a capacidade inibitória de BTCI na estrutura proteolítica e oligomérica do proteassoma de levedura 20S.

VI. Bibliografia

- [1] P. Correa, Cancer Res. 28 (41) (1981) 3685-3690
- [2] J. Xavier-Filho, M. M Ventura, Comments Agric. Food Chemistry I (1988) 239-264
- [3] M.M. Ventura, J. Xavier-Filho, A trypsin and chymotrypsin inhibitor from Black-eyed pea (*Vigna. sinesis*L) I. Purification and partial characterization An. Acad. Bras. Cienc. 38 (1966) 553-566
- [4] S. M. Freitas, M. M. Ventura, Analysis of the Black eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alfa-chymotrypsin complex. FEBS Letters 409 (1997) 121-128
- [5] O.L. Franco, R.C. dos Santos, J.A.N. Batista, A.C.M. Mendes, M.A.M. de Araújo, R.G. Monnerat, et al., Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*, Phytochemistry 63 (2003) 343-349.
- [6] A. da Cunha (Accessed Morales10 Alvares, ´April 2015). E.F. Schwartz, N.O. Amaral, N.R. Trindade, G.R. Pedrino, L.P. Silva, et al., Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides, Molecules 19 (2014) 17536-17558,
- [7] L. da C. Souza, R. Camargo, M. Demasi, J.M. Santana, C.M. de S´a, S.M. de Freitas, Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells, PLoS One 9 (2014) e86600,
- [8] A. Carvalho, M. Santos-Neto, H. Monteiro, S. Freitas, L. Morhy, N. Nascimento, et al., BTCl enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects, Braz. J. Biol. 68 (2008) 149-154,
- [9] A. Mehdad, G. Brumana, A. Souza, J. Barbosa, M. Ventura, S. M. Freitas, et al., A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition, Cell Death Discov. 2 (2016) 15067,.
- [10] G.A. Joanitti, R.B. Azevedo, S.M. Freitas, D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, et al., Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds, Cancer Lett. 293 (2010) 73-81,

- [11] Kunitz, M., Northrop, J. H. (1936). Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol* 19(6):991-1007.
- [12] Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol* 29(3):149–154.
- [13] Bowman, D.E. (1944). Fractions Derived from Soy Beans and Navy Beans Which Retard Tryptic Digestion of Casein. *Proc Soc Exp Biol Med* 57:139-140.
- [14] Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101(2635):668-669.
- [15] Bowman, D.E. (1946). Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 63(3):547-50.
- [16] Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem J* 87(2):281–284.
- [17] Odani, S., Ikenaka, T. (1972). Studies on Soybean Trypsin Inhibitors: IV. Complete Amino Acid Sequence and the Anti-proteinase Sites of Bowman-Birk Soybean Proteinase Inhibitor. *J Biochem* 71(5):839-848.
- [18] Haynes, R., Feeney, R.E. (1967). Fractionation and Properties of Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors from Lima Beans. *J Biol Chem* 242(22):5378-5385.
- [19] Frattali, V.P., Steiner, R.F. (1968). Soybean inhibitors. I. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry* 7(2):521-530.
- [20] Millar, D.B.S., Willick, G.E., Steiner, R.F., Frattali, V. (1969). Soybean Inhibitors: IV. The Reversible Self-Association Of A Soybean Proteinase Inhibitor. *J Biol Chem* 244(2):281-284.
- [21] Frattali, V. (1969). Soybean Inhibitors: III. Properties Of A Low Molecular Weight Soybean Proteinase Inhibitor. *J Biol Chem* 244(2):274-280.
- [22] M. M. Ventura, G. B. Araujo, M. A. H. Cagnin and C. O. Martin An, *Acad. Brasil Cienc.* 44, 581 (1972)
- [23] M. M. Ventura, C. O. Martin and L. Morhy, *An. Acad. Brasil Cienc.* 53. 195 (1975)
- [24] Barbosa, J.A.R.G., Silva, L.P., Teles, R.C.L., Esteves, G.F., Azevedo, R.B., Ventura, M.M., Freitas, S.M. (2007). Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with beta-Trypsin at 1.55 Å

Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases.
Biophysical Journal 92:1638-1650

- [25] Catalano, M., L. Ragona, H. Molinari, A. Tava, L. Zetta. (2003). Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self association behavior. *Biochemistry*. 42:2836–2846
- [26] Fachetti, H.C., Mizuta, K., Ventura, M.M. (1984). Thermodynamics of the Association of Trypsin with the Black-Eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor. *An Acad brasil Cienc* 56 (3): 311-317.
- [27] Freitas, S. M., Ikemoto, H., Ventura, M.M. (1999). Thermodynamics of the association of chymotrypsin with black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI) from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Protein Chemistry* 18 (3):307-313
- [28] BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. *Lipids and cell membranes*. Biochemistry, fifth edition. New York: WH Freeman, v. 1050, 2002.
- [29] NEURATH, Hans; WALSH, Kenneth A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 73, n. 11, p. 3825-3832, 1976.
- [30] HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.
- [31] KOOLMAN, Jan *et al.* *Color atlas of biochemistry*. Stuttgart: Thieme, 2005.
- [32] ZWICKL, Peter; BAUMEISTER, Wolfgang (Ed.). *The Proteasome—Ubiquitin Protein Degradation Pathway*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [33] Loidl G, Groll M, Musiol HJ, Huber R, Moroder L. (1999). Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (10): 5418–5422.
- [34] Laemmli, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- [35] Meneghetti, Luiza. **Proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* em complexo com o inibidor de serinoproteases BTCI de *Vigna unguiculata***. Tese de mestrado . Universidade de Brasília. 2018
- [36] LEME, Janaina de Moraes Maciel. Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura

Saccharomyces cerevisiae: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.